

Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der Gastrulation  
von *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Thomas-Christian Seher**

aus Peine

Köln 2004

Berichterstatter:

Frau Professor Dr. Maria Leptin  
Herr Professor Dr. Siegfried Roth

Tag der Disputation:

7. Januar 2003



## Inhaltsverzeichnis

|   |               |
|---|---------------|
| <b>Kapitel 1: Einleitung</b>  | <b>9</b>      |
| 1.1 Gastrulation  | 10            |
| 1.2 Gastrulation in <i>Drosophila</i>   | 13            |
| 1.2.1 Beschreibung der Gastrulation von <i>Drosophila melanogaster</i>  | 13            |
| 1.2.2 Die Kontrolle der Gastrulation in <i>Drosophila melanogaster</i>  | 17            |
| 1.2.3 Einordnung der Gastrulation in den Entwicklungszusammenhang in <i>Drosophila melanogaster</i>   | 30            |
| 1.2.4 Offene Fragen   | 35            |
| Das Ziel der vorgelegten Arbeit   | 38            |
| <br><b>Kapitel 2: Ergebnisse</b>  | <br><b>39</b> |
| <b>2.1. Defizienzenscreen zur Identifizierung neuer an der Ventralfurchenbildung beteiligter Gene</b>   | <b>39</b>     |
| 2.1.1. Die Regionen, die als notwendig für einen ordnungsgemäßen Ablauf der Ventralfurchenbildung identifiziert wurden und die korrespondierenden mutanten Phänotypen | 44            |
| 2.1.2. Untersuchung von Doppeldefizienzen aus den identifizierten Regionen  | 49            |
| 2.1.3. Untersuchung ventral exprimierter Gene auf genetische Interaktion mit <i>folded gastrulation</i> hin   | 52            |
| <b>2.2. Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle des Gens <i>twist</i> während der Ventralfurchenbildung</b>  | <b>57</b>     |
| 2.2.1 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen des Defizienzen-Screens und daraus resultierende Überlegungen zur Rolle von <i>twist</i>                                  | 57            |
| 2.2.2 Beschreibung der morphogenetischen Restaktivität in <i>twist</i> -Mutanten  | 59            |
| 2.2.3 Ventralfurchenbildung ohne <i>twist</i> -Aktivität? Der Versuch <i>twist</i> durch seine Zielgene zu ersetzen   | 66            |
| 2.2.3.1 Morphologische Analyse der Rettungsexperimente in <i>twist</i> -Mutanten  | 67            |
| 2.2.3.2 Statistiken der Rettungsexperimente in <i>twist</i> -Mutanten   | 70            |
| 2.2.3.3 Beurteilung der Transgene   | 75            |

|  |            |
|--|------------|
| <b>2.3. Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle des Gens <i>snail</i> während der Ventralfurchenbildung</b>   | <b>79</b>  |
| 2.3.1 Die Zielgene von <i>snail</i>  | 79         |
| 2.3.2 Misexpression von Zielgenen von <i>snail</i> in der Mesodermanlage   | 82         |
| 2.3.2.1 Situationen mit verminderter repressiver Kapazität von <i>snail</i>  | 85         |
| A: <i>snail</i> -Heterozygote  | 85         |
| B: Interaktionen von <i>snail</i> mit seinem Co-Repressor dCtBP  | 86         |
| C: Das Allel <i>snail</i> <sup>V2</sup>  | 89         |
| 2.3.2.2 Überexpression von Zielgenen von <i>snail</i> mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems   | 95         |
| 2.3.3 Indizien für eine erweiterte Rolle von <i>snail</i> :  | 98         |
| Snail als möglicher Aktivator von Transkription im Mesoderm  |            |
| <b>2.4. Die Koordination von Zellproliferation und Morphogenese:</b>   | <b>103</b> |
| <b>Die Kontrolle der Zellteilungen im mesodermalen Primordium während der Ventralfurchenbildung</b>  |            |
| 2.4.1 Untersuchung der Phänotypen der Deletionen <i>Df(3L)BK10</i> und <i>Df(3L)ri79c</i> bzw. <i>Df(3L)rdgC[co2]</i> : Die Zellen des Mesodermprimordiums teilen sich vorzeitig                           | 103        |
| 2.4.2 Frühzeitige Mitosen sind die Ursache für die Störung der Ventralfurchenbildung in <i>Df(3L)ri79c</i> und <i>Df(3L)rdgC[co2]</i>  | 114        |
| 2.4.3 Feinkartierung des von <i>Df(3L)ri79c</i> und <i>Df(3L)rdgC[co2]</i> aufgedeckten Locus und Identifizierung des Gens, dessen Verlustmutation zu dem mitotischen Phänotyp im Mesodermprimordium führt | 118        |
| 2.4.4 Die Identifizierung des Transkripts von <i>tribbles</i>  | 124        |
| 2.4.4.1 Identifizierung des Transkripts: cDNA-Sequenz und Genomische Struktur von <i>tribbles</i>  | 124        |
| 2.4.4.2 Die Proteinsequenz von Tribbles  | 128        |
| 2.4.5 Überexpressions- und Injektionsexperimente mit <i>tribbles</i>   | 129        |
| 2.4.5.1 Subzelluläre Lokalisation von HA-Tribbles und lokale Überexpression durch Injektionen  | 131        |
| 2.4.6 Experimente zur Untersuchung der genetischen Regulation von <i>tribbles</i>  | 132        |

|   |                |
|---|----------------|
| <b>Kapitel 3: Diskussion</b>  | <b>139</b>     |
| 3.1 Ergebnisse des Defizienzen-Screens  | 139            |
| 3.1.1 Phänotypischer Screen und Beurteilung der Test-Methode  | 139            |
| 3.1.2 Bewertung des Defizienzen-Screens   | 140            |
| 3.1.3 Die Abdeckung des Genoms durch den Defizienzen-Screen   | 141            |
| 3.1.4 Bewertung der identifizierten Mutanten und ihrer Phänotypen   | 143            |
| 3.1.5 Gesamtbeurteilung des Defizienzen-Screens und des gewählten Ansatzes                                      | 150            |
| 3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von <i>twist</i>   | 152            |
| 3.3 Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von <i>snail</i>   | 159            |
| 3.3.1 Ektopische Expression von Zielgenen von <i>snail</i> im Mesoderm  | 159            |
| 3.3.2 <i>snail</i> als möglicher Aktivator von Genaktivität im Mesoderm   | 164            |
| 3.4 Die Koordination von Morphogenese und Zellteilungen während der Ventralfurchenbildung durch <i>tribbles</i> | 167            |
| <br><b>Kapitel4: Zusammenfassung und abstract</b>   | <br><b>175</b> |
| <b>Kapitel5: Material und Methoden</b>  | <b>177</b>     |
| <b>Kapitel6: Literaturverzeichnis</b>   | <b>193</b>     |
| Danksagung  |                |
| Erklärung   |                |
| Lebenslauf  |                |

Kap. 1 Einleitung

1.1 Gastrulation

1.2 Gastrulation in Drosophila

1.2.1 Beschreibung der Gastrulation von *Drosophila melanogaster*

1.2.2 Die Kontrolle der Gastrulation in *Drosophila melanogaster*

1.2.3 Einordnung der Gastrulation in den Entwicklungszusammenhang in *Drosophila melanogaster*

1.2.4 Offene Fragen

Das Ziel der vorgelegten Arbeit

### **Kap. 1 Einleitung**

#### **1.1 Gastrulation**

Gastrulation bezeichnet den Entwicklungsabschnitt während der Embryonalentwicklung, in dessen Verlauf durch morphogenetische Prozesse die Keimblätter und damit die Grundarchitektur des Embryos entstehen. Diesen Prozess durchläuft der Embryo jeder Tierart (Gilbert, 1997). Vor der Gastrulation stellt der Embryo meist ein einschichtiges Epithel dar, welches nachfolgend eine völlige Umstrukturierung erfährt. Im Verlauf der Gastrulation gelangen Zellen ins Innere, um Endoderm und Mesoderm zu bilden, während die auf der Außenseite des Embryos verbleibenden Zellen das Ektoderm und extraembryonales Gewebe bilden (Gilbert, 1997).

Aus den drei Keimblättern gehen jeweils charakteristische Derivate hervor. Aus dem Ektoderm entsteht das Nervensystem, aus dem Endoderm der größte Teil des Verdauungstraktes und aus dem Mesoderm die meisten der inneren Organe, wie Herz, somatische und viszerale Muskulatur sowie das Blutsystem (Gilbert, 1997).

Als Beispiel für einen morphogenetischen Prozess ist die Gastrulation herausragend: Die grundlegende Umgestaltung des Embryos und die Vielzahl der dabei beobachtbaren Teilprozesse haben Generationen von Embryologen fasziniert und dazu geführt, daß die Gastrulation in einem breiten Spektrum von Tierarten untersucht und beschrieben wurde (Gilbert, 1997). Darüber hinaus haben die vielfältigen Mechanismen während der Gastrulation modellhaften Charakter für andere biologische Prozesse. Typische im Verlauf der Gastrulation auftretende morphogenetische Mechanismen wie epitheliale Faltungen und Invaginationen, Involutionbewegungen, Epibolie, Wanderung von Einzelzellen, Delamination von Zellen oder Zell-Interkalation spielen auch in vielen anderen Zusammenhängen eine wichtige Rolle (z.B. Neurulation, Invasion von Blutzellen in entzündete Gewebe, Regenerationsprozesse (Gilbert, 1997; Wolpert, 1998)).

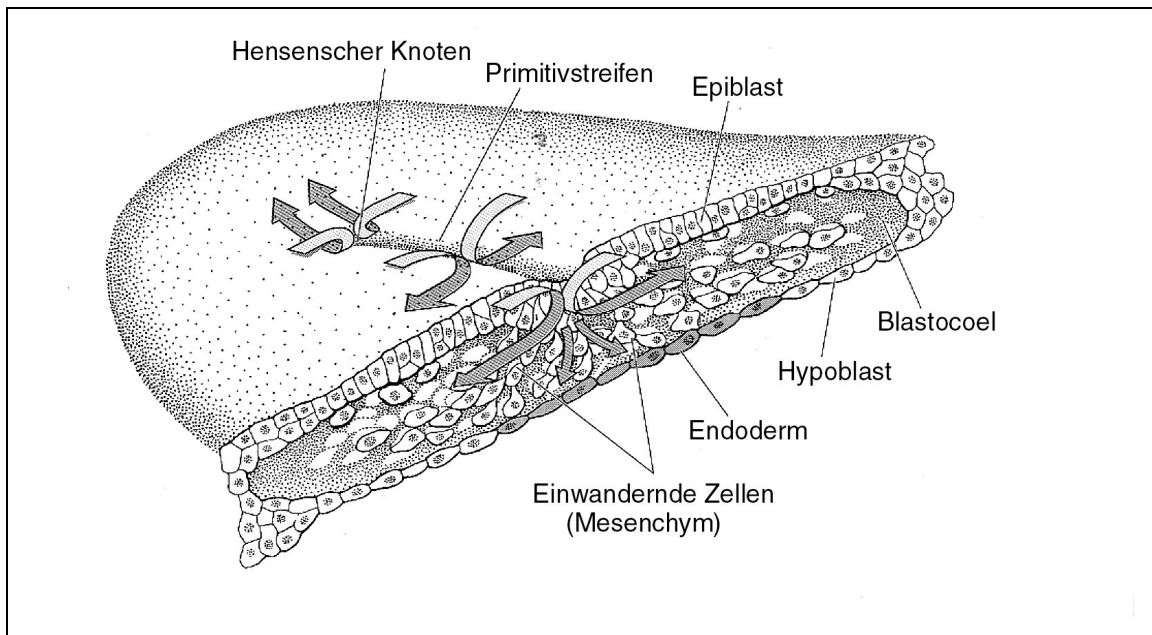


Abb. 1.1: Gastrulation im Hühnerembryo. Invagination, Einwanderung von Zellen und Delamination sind die charakteristischen morphogenetischen Prozesse und finden gleichzeitig statt. Nach Gilbert, S.F., leicht verändert.

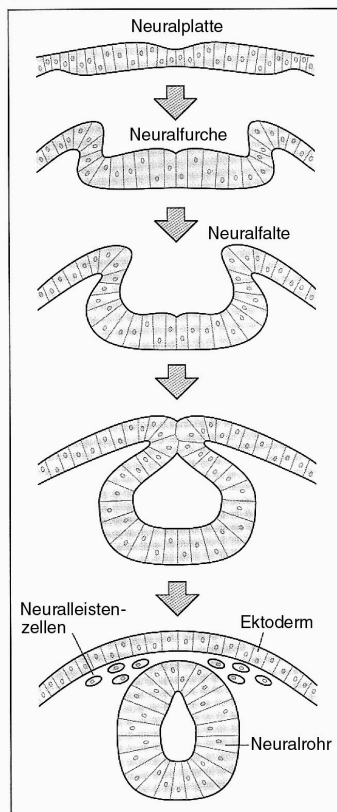


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Neurulation im Vertebratenembryo. Die Neurulation ist ein typischer Invaginationsprozess, der auf Zellformänderungen beruht. Ähnliche Prozesse können in Embryonen vieler Arten auch während der Gastrulation beobachtet werden, etwa in *Drosophila*, bei Seeigeln oder auch in Embryonen von Vertebraten. Nach Wolpert, L. et al., leicht verändert.

Während sich die klassischen Embryologen mit der Beschreibung der morphogenetischen Prozesse und der Zuordnung der beteiligten Zellen im Hinblick auf die Keimblätter und ihre Derivate beschäftigten, stehen in der modernen Biologie die Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen im Vordergrund, die die vielfältigen und tiefgreifenden Veränderungen während der Gastrulation steuern.

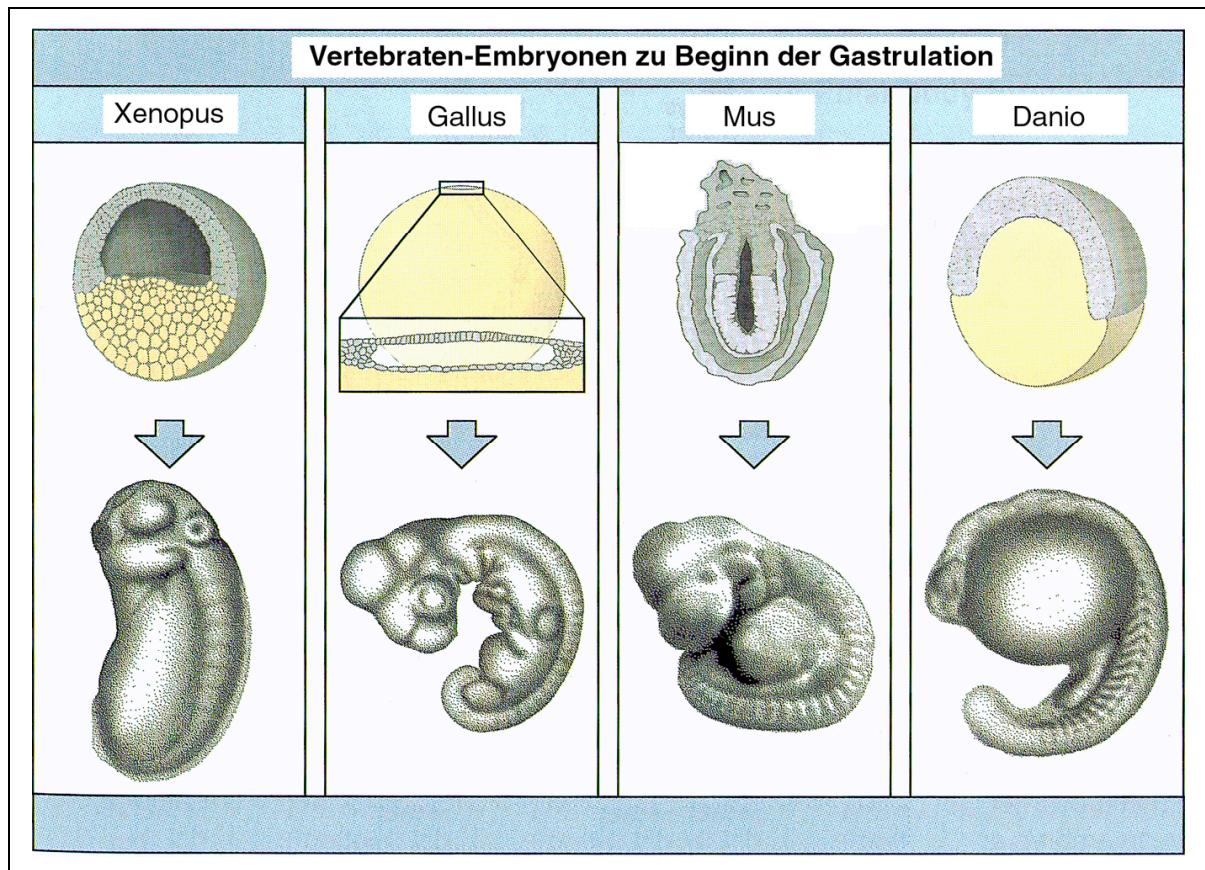


Abb. 1.3: Die vier wichtigsten Modellsysteme der Vertebraten, in denen die Gastrulation studiert wird. (Wolpert, 1998)., leicht verändert.

In der Gegenwart wird die Gastrulation in einer Reihe von Modellsystemen untersucht. Die eine Gruppe sind Modellorganismen, die aus der Gruppe der Vertebraten stammen. Dazu gehören vor allem *Gallus gallus*, *Danio rerio* und insbesondere *Xenopus laevis* und *Mus musculus* (Gilbert, 1997; Wolpert, 1998). Auf der anderen Seite stehen die Modellorganismen, die zu den Invertebraten gehören. Hier sind verschiedene Seeigelarten und *Drosophila melanogaster* die prominentesten Beispiele (Costa et al., 1993; Gilbert, 1997; Leptin, 1995).



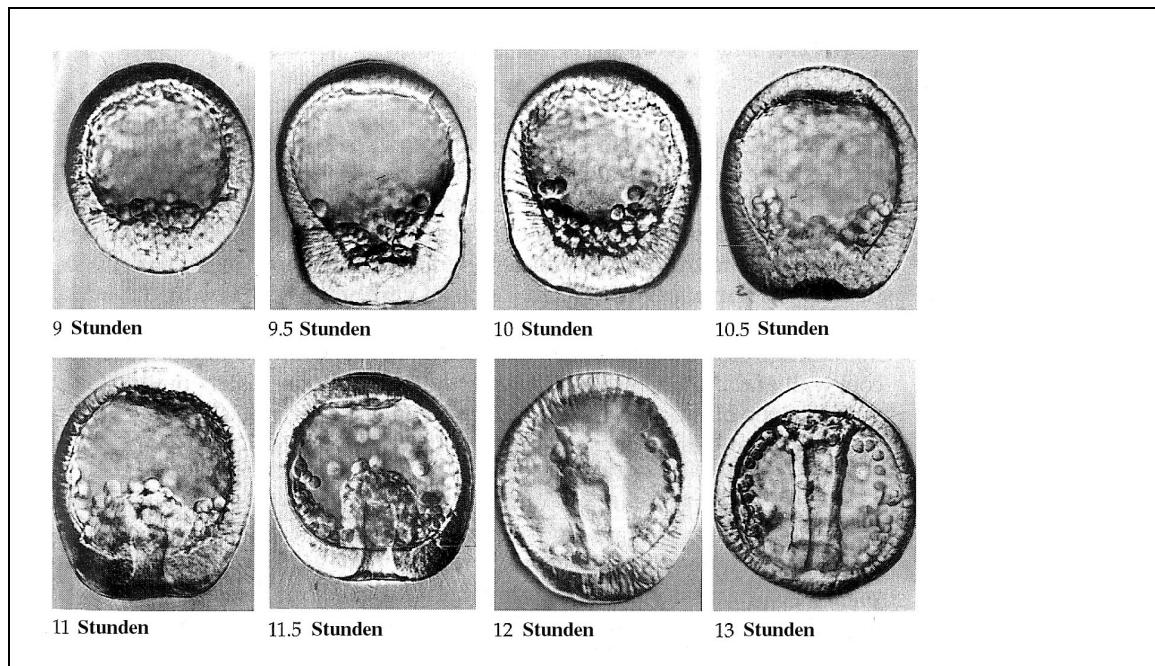


Abb. 1.4: Eine Sequenz aufeinanderfolgender Gastrulationsstadien von *Lytechinus variegatus*, fotografiert an lebenden Embryonen. Nach Gilbert, S.F.

Unter den genannten Modellorganismen ist *Drosophila melanogaster* derjenige, der mit genetischen Methoden am besten untersucht werden kann (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Gilbert, 1997; Martinez -Arias and Bate, 1993; Roberts, 1998; Wolpert, 1998).

## 1.2 Gastrulation in *Drosophila*

### 1.2.1. Beschreibung der Gastrulation in *Drosophila melanogaster*

Eine Übersicht der Gastrulation in Wildtyp-Embryonen von *Drosophila* ist in Abb. 1.5 gezeigt. Sie aufeinanderfolgende Stadien in einer Serie von Querschnitten. Die Embryonen wurden mit Hilfe von Antikörpern gefärbt, um die Morphogenese besser verfolgen zu können. Die Färbung gegen Twist (braune Färbung) markiert den ventralen Bereich des Embryos. Dieser umfasst unter anderem die gesamte Mesodermanlage ((Leptin, 1991b; Leptin and Grunewald, 1990) zur Festlegung der Grenzen der Mesodermanlage s. Kap. 1.2.2).



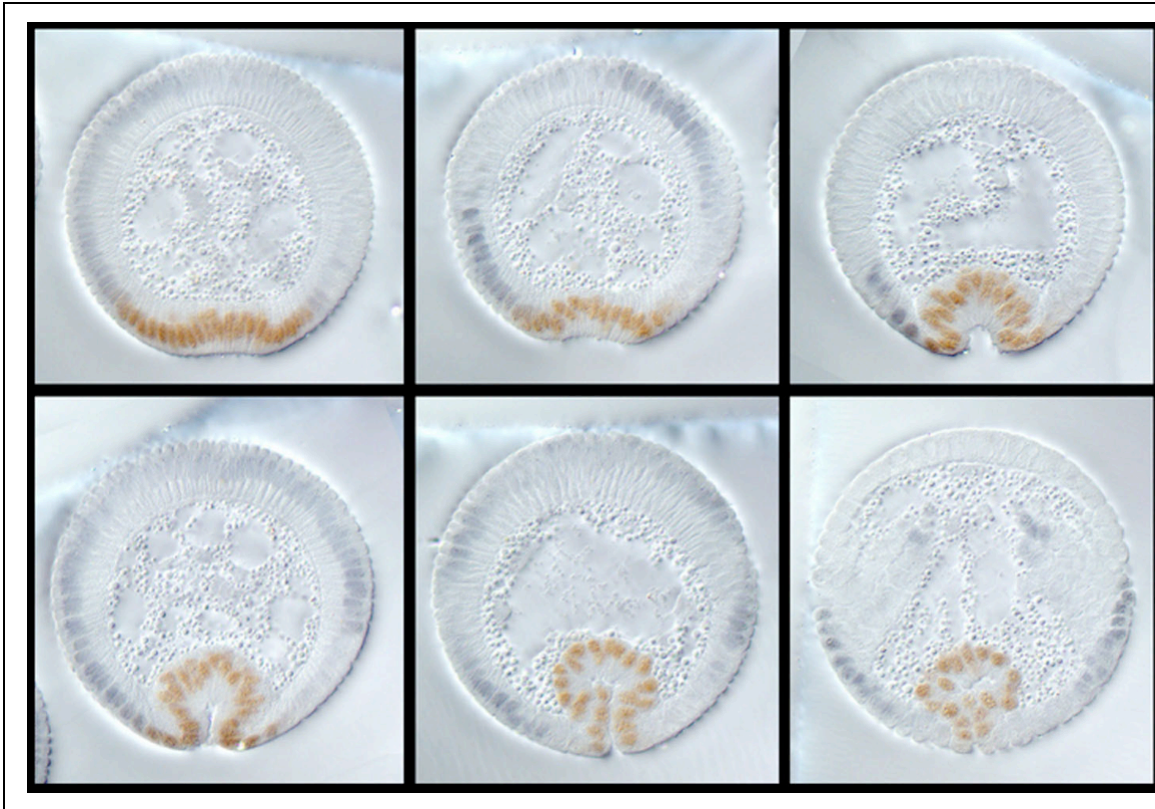


Abb. 1.5: Ventralfurchenbildung in *Drosophila*. Zu sehen ist eine Serie von Querschnitten aufeinanderfolgender Gastrulationsstadien. Die Embryonen sind mit den gleichen Antikörpern markiert wie in Abb. 2.1. Die gezeigten Stadien entsprechen denen der Embryonen, die in Abb. 2.1 abgebildet sind. Abflachung der apikalen Oberflächen der mesodermalen Zellen, apikale Konstriktionen, Bewegung der Zellkerne in basaler Richtung, Verkürzung der Zellen, die resultierende Invagination der Mesodermanlage, die Bildung der epithelialen Röhre und die sogleich einsetzende Auflösung der epithelialen Struktur nach der Invagination des Mesoderms sind zu sehen.

Ein Großteil des mit Twist markierten Bereichs invaginiert kurz nachdem der Embryo das Stadium des zellularen Blastoderms erreicht hat, etwa zweieinhalb Stunden nach der Ablage des befruchteten Eis (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Roberts, 1998) s. Kapitel 1.2.3). Die dabei entstehende Vertiefung wird *Ventralfurchung* genannt. Die Ventalfurchenbildung ist das erste morphogenetische

Ereignis der Gastrulation, das beobachtet werden kann und zur Invagination der Mesodermanlage führt. Wie man in den Querschnitten sehen kann, beruht die Bildung der Ventralfurche darauf, daß die mesodermalen Zellen eine charakteristische Abfolge von Formänderungen durchlaufen (Costa et al., 1993; Leptin and Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991). Zuerst kann eine Abflachung der gerundeten Oberfläche der mesodermalen Zellen beobachtet werden. Danach erfolgt eine Verengung (Konstriktion) der apikalen Oberfläche der Zellen. Gleichzeitig ändert der Zellkern seine Position und wandert von apikal nach basal. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits eine deutliche Furche erkennbar. Nachfolgend invaginiert das Mesoderm, wenn die Zellen sich in apikal-basaler Richtung verkürzen (Costa et al., 1993; Leptin and Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991). Die Ventralfurche schließt sich und das Mesoderm liegt nun als eine lange epitheliale Röhre im Innern des Embryos. Dieser Zellverband verliert kurz danach seine epithelialen Eigenschaften. Er zerfällt in Einzelzellen und das Mesoderm nimmt einen mesenchymalen Charakter an. Dabei breitet sich das Mesoderm auf dem darunterliegenden Ektoderm aus und die Zellen beginnen sich zu teilen (Leptin and Grunewald, 1990). Die Invagination des Mesoderms ist ein sehr schneller Prozess: Die Bildung der Ventralfurche dauert nur wenige Minuten und die gesamte Invagination des Mesoderms benötigt rund 15 Minuten (Leptin and Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991).

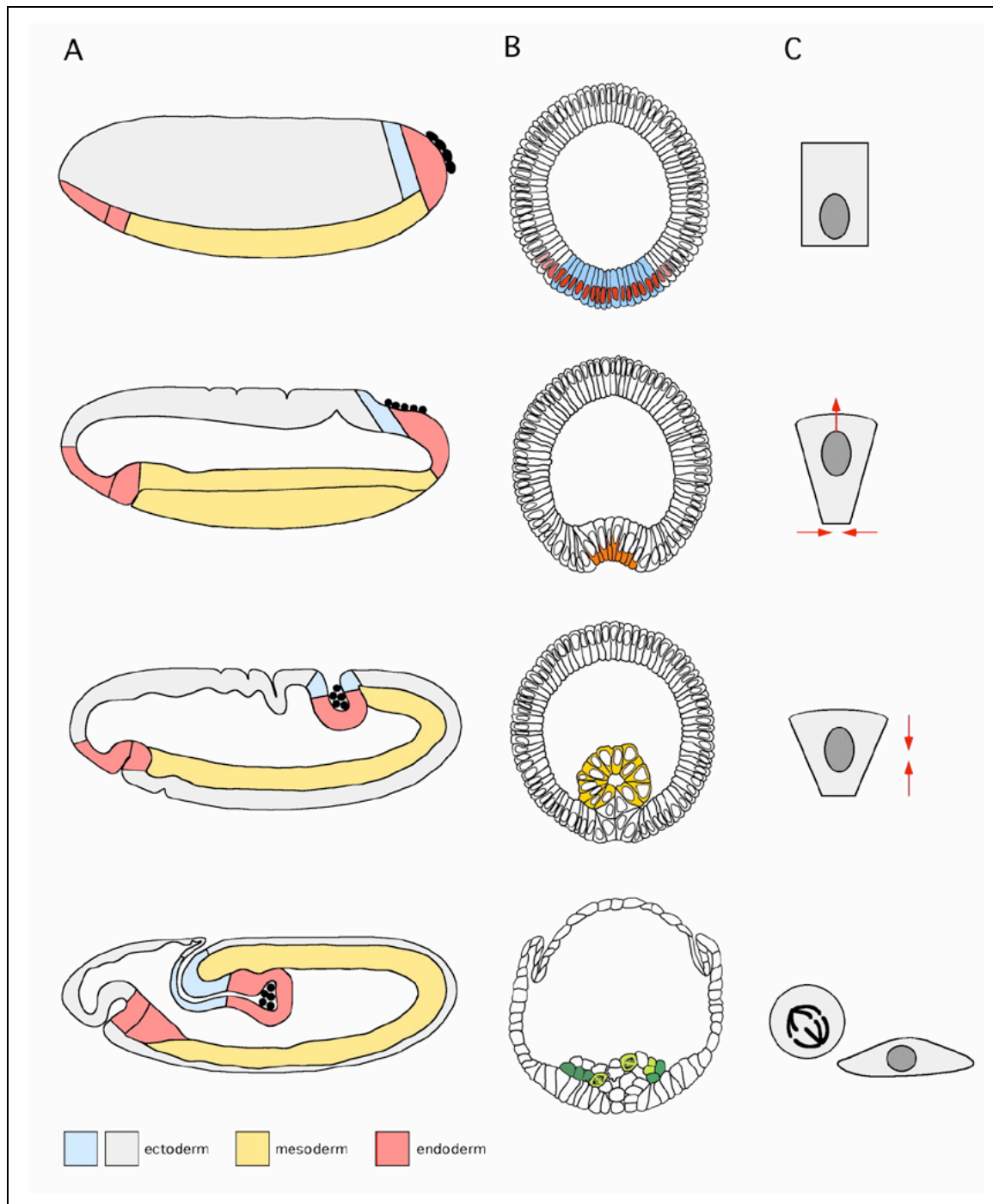


Abb. 1.6: Ein schematischer Überblick über die Prozesse, die zur Invagination des Mesoderms in *Drosophila* führen. A zeigt in Längsschnitten die Anlagenkarte des Embryos und die verschiedenen morphogenetischen Bewegungen, die zur Bildung der Keimblätter und zum Beginn der Organogenese führen. In B sind in schematischen Querschnitten die Ereignisse der frühen Mesodermmorphogenese dargestellt. C zeigt die Ereignisse im Mesoderm auf Einzelzellniveau. In jedem der dargestellten Gastrulationsstadien erfolgen charakteristische Zellformänderungen. Im letzten abgebildeten Stadium teilen sich die Zellen des Mesoderms und breiten sich auf dem Ektoderm aus. Abbildung von Maria Leptin.

Parallel zur Ventralfurchenbildung finden noch mehrere andere morphogenetische Bewegungen statt, die auch auf den Abbildungen 1.6 und 2.1 zu sehen sind: Die Ausstreckung des Keimstreifs, die Invaginationen der posterioren und der anterioren Mitteldarmanlagen (sowie Vorder- und Hinterdarmanlage), die Bildung der Kopffalte (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997; Martinez -Arias and Bate, 1993; Roberts, 1998).

Die Invagination des Mesoderms erfolgt zellautonom und die gesamte mechanische Kraft für diesen Prozess wird in der Mesodermanlage selbst erzeugt. Das heißt, daß die Zellformänderungen in jeder Zelle autonom ausgelöst werden und die Gesamtheit aller Zellformänderungen zur Invagination der Mesodermanlage führt (Leptin and Grunewald, 1990). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß zu Beginn die Zellformänderungen (apikale Abflachung und Konstriktion) in den einzelnen Zellen der Mesodermanlage in stochastischer Art und Weise geschehen (Kam et al., 1991). Dies kann als die erste Phase der Ventralfurchenbildung bezeichnet werden. In der nachfolgenden Phase ebnen sich die stochastischen Unterschiede ein und es erfolgt eine Synchronisation der Zellformänderungen. Als Folge invaginiert das Mesoderm sehr gleichmäßig auf seiner gesamter Länge (Kam et al., 1991).

### **1.2.2 Die Kontrolle der Gastrulation in *Drosophila melanogaster***

Genetische und molekulare Untersuchungen haben Mechanismen und Moleküle identifiziert, die bestimmen, wie die Keimblätter angelegt werden und darüber hinaus Grundzüge der genetischen Kontrolle der morphogenetischen Prozesse während der Gastrulation offengelegt.

#### **A Die Festlegung der Mesodermanlage**

Bereits während der Oogenese und darauf aufbauend während der frühen Embryonalentwicklung werden in *Drosophila* die Grundkoordinaten des

Embryos festgelegt. Diese bestehen in der Etablierung der Körperachsen (anterior-posteriore und dorso-ventrale Achse) und der Spezifizierung der Termini des Embryos (St. Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992). Die durch diese frühen Musterbildungsprozesse im Embryo niedergelegte Information wird in der weiteren Entwicklung gelesen und in nachfolgende Entwicklungsprozesse umgesetzt.

Auch die morphogenetischen Bewegungen während der Gastrulation basieren auf der Interpretation der frühen Musterbildung. Eine komplexe Kaskade von Ereignissen, an der vorwiegend Maternaleffektgene beteiligt sind, legt fest, wo dorsale und ventrale Seite des Embryos entstehen (Govind, 1999). Eine wichtige Konsequenz der dorso-ventralen Achsenbildung ist, daß auf der ventralen Seite des Embryos das Protein Spätzle gebildet und prozessiert wird (Morisato and Anderson, 1994; Roth, 1993; Schneider et al., 1994; Stein et al., 1991). Spätzle ist der Ligand des Rezeptors Toll (Anderson et al., 1985), der zwar ubiquitär exprimiert ist, aber wegen der auf die ventrale Seite begrenzten Aktivität von Spätzle nur eben dort aktiviert wird. Die Aktivierung von Toll und die dadurch ausgelöste Signalkette haben zur Folge, daß der Transkriptionsfaktor Dorsal, der bis zu diesem Zeitpunkt im Zytoplasma lokalisiert ist, von dort in den Kern verlagert wird (Roth et al., 1989; Stein et al., 1991). In Abhängigkeit vom Grad der Aktivierung der Toll-Rezeptoren wird Dorsal umso effizienter in die Kerne aufgenommen, je mehr Toll aktiviert wurde, das heißt, je mehr ventral ein Kern gelegen ist. Am Ende der gesamten dorso-ventralen Kaskade steht somit die Übersetzung der Musterbildungsinformation in die differentielle Aufnahme des Transkriptionsfaktors Dorsal in die Kerne des Blastodermembryos. Dieser "Import-Gradient" entlang der dorso-ventralen Achse des Embryos führt in Abhängigkeit von der Kern-Konzentration von Dorsal zur spezifischen Aktivierung verschiedener zygotischer Gene, die die Schicksale der Zellen, in denen sie exprimiert sind, festlegen (Belvin et al., 1995; Roth et al., 1989). Ebenfalls in Abhängigkeit von seiner Kernkonzentration agiert Dorsal in dorsalen Bereichen des Embryos auch als spezifischer Repressor von Gentranskription. Diese Zielgene (z.B. *decapentaplegic*, *zerknüllt*) spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der dorsalen Epidermis (Arora and Nusslein-Volhard, 1992).

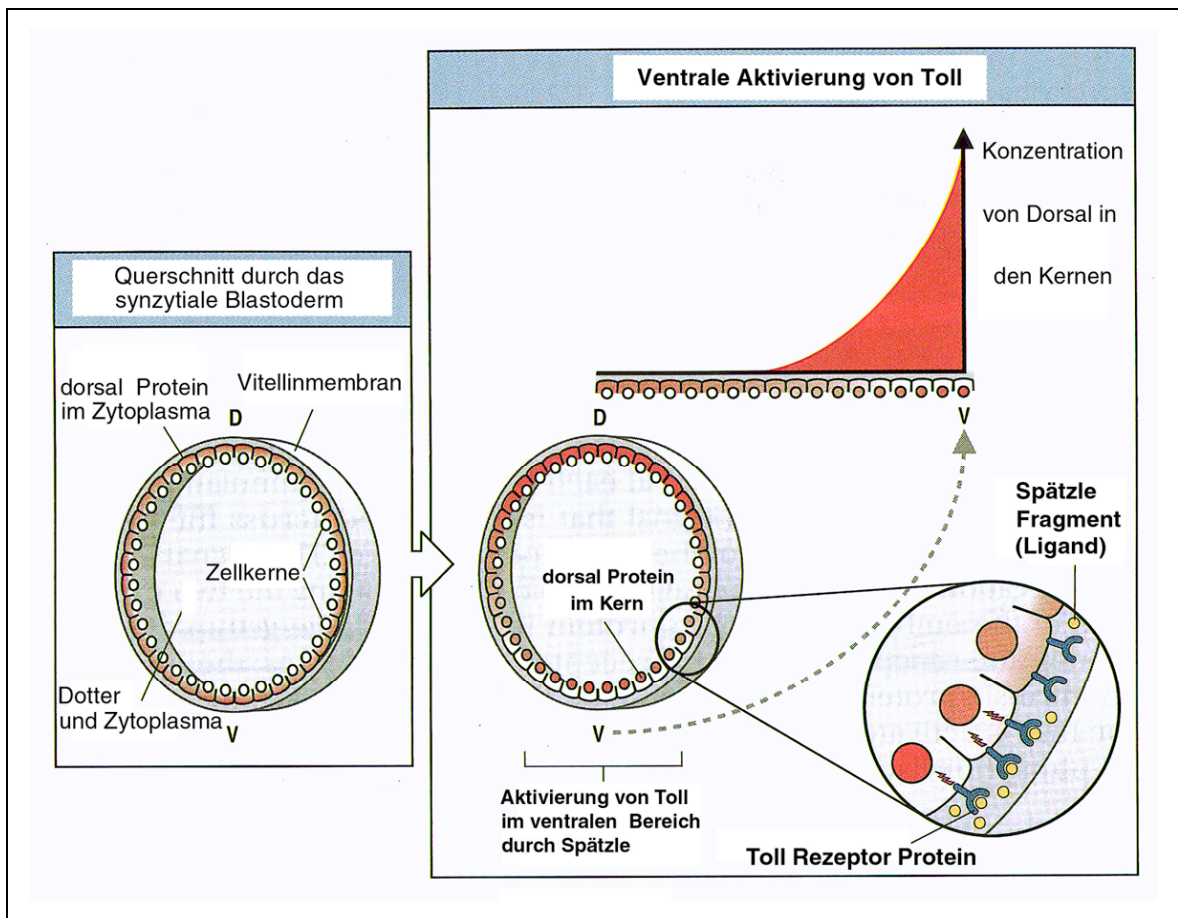


Abb. 1.7: Positionelle Information entlang der dorso-ventralen Achse des Embryos wird durch das Protein Dorsal vermittelt. Erläuterungen siehe Text. Nach Wolpert, L., verändert.

Auf der ventralen Seite des Embryos, wo die Konzentration von Dorsal im Kern am höchsten ist, wird die Transkription mehrerer Gene aktiviert. Zu diesen gehören *snail* und *twist*. Sie werden in den am meisten ventral gelegenen Region exprimiert (Ip et al., 1992; Jiang et al., 1991). *snail* und *twist* kontrollieren die Entwicklung des Mesoderms. Verlustmutationen eines der beiden Gene führen dazu, daß weder eine Invagination der Mesodermanlage noch eine Differenzierung der in ihr liegenden Zellen stattfinden. Es bildet sich somit in beiden Fällen kein Mesoderm (Leptin and Grunewald, 1990; Simpson, 1983). Trotz intensiver genetischer Untersuchungen der frühen embryonalen Entwicklung wurden keine weiteren zygotischen Faktoren gefunden, die ähnlich essentiell für die Entwicklung des Mesoderms sind wie *snail* und *twist* (Jürgens et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984; Wieschaus et al., 1984). Weitere zygotische Faktoren, die die

Mesodermentwicklung in vergleichbarer Weise kontrollieren, existieren daher vermutlich nicht.

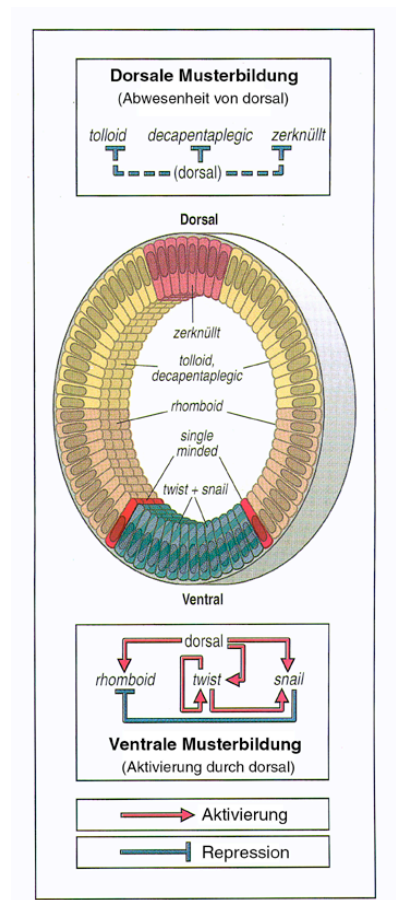


Abb. 1.8: Die Genregulationskaskade, die zur Musterbildung des Embryos während des Blastodermstadiums führt. Der Kernimport-Gradient von Dorsal wird entlang der dorso-ventralen Achse des Embryos in die spezifische Aktivierung oder Repression der frühen Musterbildungsgene umgesetzt. Nach Wolpert, L., verändert.

*snail* und *twist* sind gegen Ende des Blastodermstadiums nur auf der ventralen Seite des Embryos exprimiert, aber ihre Domänen sind nicht vollständig deckungsgleich (vergleiche Abb. 1.9 und 2.1). Am posterioren Ende der ventralen Seite ist nur *twist* exprimiert, während *snail* eine scharfe posteriore Grenze hat, die mit dem posterioren Ende der Ventralfurche zusammenfällt (Leptin, 1991b). Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der lateralen Begrenzung der Expression von *snail* und *twist*. Während *snail* eine scharfe Grenze zum benachbarten Mesektoderm ausbildet, nimmt die Expression von *twist* über die Grenze der *snail*-Domäne hinaus graduell ab und erstreckt sich bis ins Ektoderm (Leptin, 1991b).



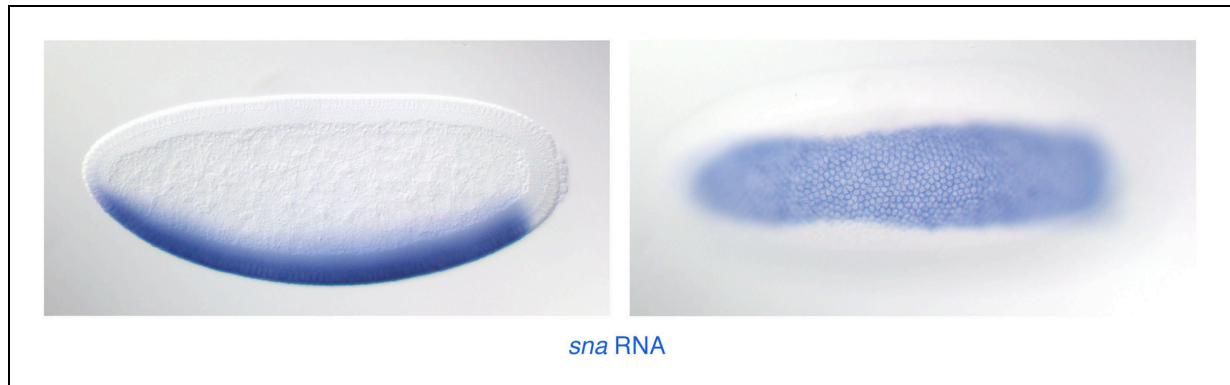


Abb. 1.9: Die Expression von *snail* im Blastodermembryo. Links ist ein optischer Schnitt und rechts eine Aufsicht auf die ventrale Seite desselben Embryos zu sehen.

An den beiden Enden des Embryos jenseits der Mesodermanlage liegen jeweils die Anlagen für Mittel- und Hinterdarm. Für deren Spezifizierung ist das Gap-Gen *huckebein* essentiell. *huckebein* agiert als Repressor, und es konnte gezeigt werden, daß die posteriore Begrenzung von *snail* durch *huckebein* festgelegt wird, indem die Expression von *snail* am hinteren Körperpol des Embryos reprimiert wird. In Embryonen, die mutant für *huckebein* sind, dehnt sich nicht nur die Expressionsdomäne von *snail* bis zum posterioren Pol aus. Auch die Ventralfurche verlängert sich bis zum posterioren Ende der Embryos und folgt damit der *snail*-Domäne (Reuter and Leptin, 1994).

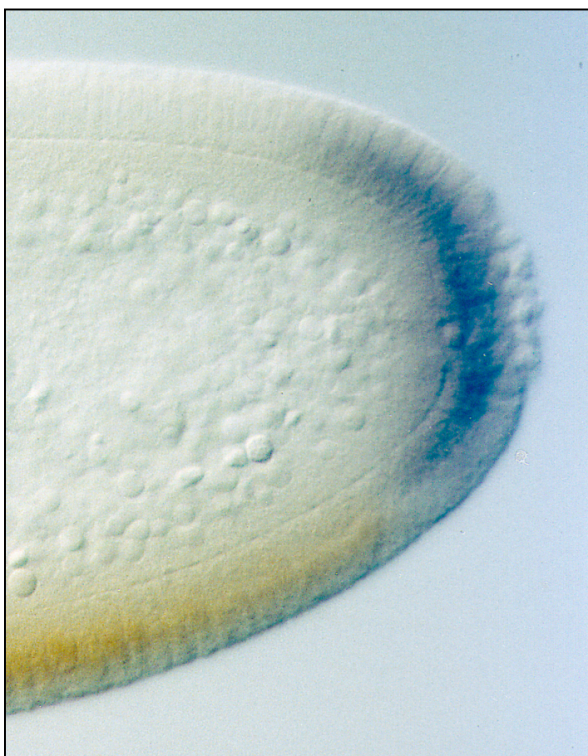


Abb. 1.10: *huckebein* begrenzt die posteriore Ausdehnung der *snail*-Domäne in. Zu sehen sind Markierungen gegen *huckebein* RNA (blau) und *snail* Protein (braun). Abbildung von Rolf Reuter und Maria Leptin (Reuter and Leptin, 1994).



Die genetische Kontrolle im anterioren Bereich der Ventralseite ist verschieden von der der posterioren Zone. Dies folgt aus der Beobachtung, daß sowohl *twist* als auch *snail* bis zum anterioren Pol exprimiert sind, obwohl auch *huckebein* am anterioren Pol des Embryos exprimiert ist. Daraus läßt sich schließen, daß *snail* in der anterioren Region von *huckebein* nicht reprimiert wird (Reuter and Leptin, 1994). Die Situation dort ähnelt wegen der überlappenden *snail*- und *twist*-Domänen der Situation des posterioren Pols in *huckebein*-Mutanten. Man könnte daher erwarten, daß sich die Ventralfurche bis zur anterioren Spitze des Embryos erstreckt. Die Ausdehnung der Ventralfurche nach anterior erfolgt jedoch erst dann, wenn die Embryonen mutant für *huckebein* sind. Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, daß *huckebein* in diesem Bereich des Mesoderms nicht *snail* selbst, sondern Zielgene von *snail* oder *twist* reprimiert, und auf diese Weise die Ventralfurche nach anterior begrenzt. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß *huckebein* zur Spezifizierung des anterior zur Ventralfurche gelegenen Blutzellprimordiums und für die weiter anterior gelegene vordere Mitteldarmanlage benötigt wird (Costa et al., 1993).

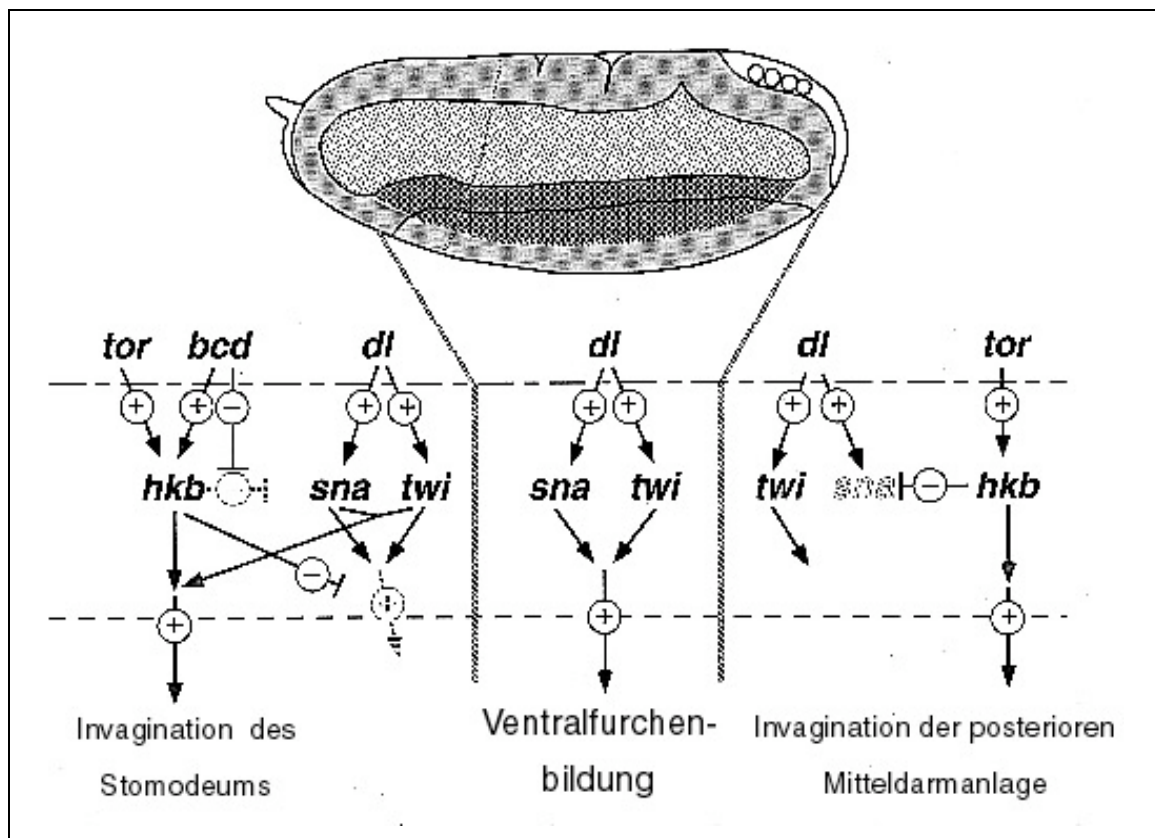


Abb. 1.11: Die genetischen Interaktionen, die zur Festlegung der Mesodermanlage und der Ausdehnung der Ventralfurche führen. Abbildung nach (Reuter and Leptin, 1994);

Die Ausdehnung der Mesodermanlage entlang der dorso-ventralen-Achse folgt der *snail*-Domäne. Die *snail*-Expression hat im Gegensatz zu *twist* eine scharfe Grenze zum benachbarten Mesektoderm. Daß die Invagination der *snail*-Domäne folgt, wird deutlich, wenn man gastrulierende Embryonen gegen den mesektodermalen Marker *single-minded* färbt. *single-minded* ist in je einer Zellreihe zu beiden Seiten des Mesoderms exprimiert und spezifiziert das Mesektoderm. Wenn sich die Ventralfurche schließt, treffen die beiden Reihen *single-minded* positiver Zellen genau aufeinander. Sie stellen (in ventro-dorsaler Richtung) genau die ersten Zellen dar, die nicht invaginieren. Alle Zellen ventral des Mesektoderms invaginieren. *snail* legt nach ventral die Grenze der Mesektodermexpression fest. Wird die *snail*-Domäne verkleinert, verschiebt sich die Position der Zellen, die *single-minded* exprimieren, nach ventral an die *snail*-Domäne heran. Die Ventralfurche in solchen Embryonen ist entsprechend geschmälert. Daraus folgt, daß *snail* die dorsale Begrenzung der Ventralfurche definiert (Kosman et al., 1991; Leptin, 1991b).

Somit legen vor allem die drei zygotischen Transkriptionsfaktoren *snail*, *twist* und *huckebein* die Positionen und Proportionen der drei Keimblätter, und die Ausdehnung der Ventralfurche, sowohl in anterior-posteriorer als auch ventro-dorsaler Richtung fest.

### **B Gene, die an der Steuerung der Ventralfurchenbildung beteiligt sind**

#### **I) Zygotische Faktoren**

Wie oben beschrieben, wird im Blastodermstadium durch Dorsal die Transkription von *snail* und *twist* auf der Ventralseite des Embryos aktiviert. Die Aktivierung von Dorsal besteht nur anfänglich. Kurz nach der Aktivierung von *twist* und *snail* durch Dorsal übernimmt *twist* diese Rolle und aktiviert nun seinerseits *snail*

und mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus auch sich selbst (Leptin, 1991b).

Da *snail* und *twist* für Transkriptionsfaktoren kodieren, liegt es nahe, daß sie die Genaktivität weiterer Gene regulieren, die für die Entwicklung des Mesoderms notwendig sind. Es spricht jedoch vieles dafür, daß *snail* und *twist* die Aktivität anderer Gene auf verschiedenen Wegen kontrollieren und somit unterschiedliche Funktionen während der Ventralfurchenbildung haben (Leptin, 1991b; Leptin, 1999).

Twist ist ein Protein mit einem basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motiv, das als DNA-Bindungsdomäne fungiert. Twist aktiviert die Transkription von Genen, die für Morphogenese und Differenzierung des Mesoderms notwendig sind. Beispiele sind *tinman* oder *poxmeso*. Zielgene von *twist*, die für die Invagination des Mesoderms essentiell sind, wurden bisher nicht gefunden.

Snail ist ein Protein der Zinkfingerklasse, das am Carboxy-Terminus fünf Zinkfinger aufweist. Diese können direkt an spezifische DNA-Motive, sogenannte E-Boxen, binden. Snail ist - wie die meisten anderen Zinkfingerproteine auch - als Repressor von Transkription beschrieben worden (Nieto, 2002). Zielgene, die von *snail* reprimiert werden, sind im Blastodermembryo solche, die entweder im angrenzenden Mesektoderm oder Ektoderm oder im gesamten Ektoderm aktiv sind. Diese werden normalerweise nicht im Mesoderm exprimiert, weil sie dort von *snail* reprimiert werden (s. Kap. 2.3 (Leptin, 1991b)). Die bisher identifizierten Gene, die von *snail* in der Mesodermanlage reprimiert werden, haben verschiedene Funktionen. Sie sind notwendig für die Musterbildung im Ektoderm, für die Etablierung von Zellpolarität und Adhäsion in ektodermalen Epithelien und für die Entwicklung des embryonalen Nervensystems. Von den bisher bekannten Zielgenen von *snail* fallen die meisten in die letzte Gruppe. Fehlt die Funktion von *snail* in der Mesodermanlage, dehnen sich die Expressionsdomänen seiner Zielgene auf die ventrale Seite aus. Sie sind nun in ähnlich starker Weise in Ektoderm und Mesoderm exprimiert. In *snail*-Mutanten findet keine Invagination des Mesodermprimordiums statt (Leptin and Grunewald, 1990; Simpson, 1984). Auch Merkmale der weiteren Mesodermmorphogenese wie die Erlangung mesenchymaler Eigenschaften oder Zellteilungen werden nicht beobachtet (Leptin and Grunewald, 1990). Außerdem ist die Expression von mesodermalen Markern, die charakterisch für die Differenzierung

des Mesoderms sind, gestört. Die Funktion von *snail* ist also notwendig für alle Aspekte der frühen Mesodermentwicklung.

Wegen der Funktion von *snail* als Repressor liegt der Schluß nahe, daß der Phänotyp von *snail*-Mutanten vor allem darauf beruht, daß Gene, die normalerweise nicht im Mesoderm exprimiert sind, in *snail*-Mutanten ihre Aktivität in der Mesodermanlage entfalten können und damit die Eigenschaften des Mesoderms grundlegend verändern. Es ist beispielsweise denkbar, daß mit der Differenzierung des Mesoderms in Konflikt stehende Zellschicksals-Entscheidungen getroffen werden. Ein solcher Konflikt wäre etwa die gleichzeitige Spezifizierung von Zellen in Richtung auf eine Entwicklung zu somatischen Muskelzellen und Neuroblasten. Es ist auch denkbar, daß die Aktivität ektodermaler Gene in der Mesodermanlage dazu führt, daß das Mesoderm epitheliale Eigenschaften erhält, die für das Ektoderm spezifisch sind, und die eine Invagination unmöglich machen. Dies würde den Gastrulationsphänotyp von *snail*-Mutanten erklären. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Expression der ektodermalen Gene im Mesoderm indirekte Effekte hat, die dazu führen, daß sowohl die Expression als auch die Aktivität von mesodermspezifischen Genen bzw. Proteinen gestört wird.

Zwar sind die vorgenannten Überlegungen naheliegend, aber daß die essentielle Funktion von *snail* darin besteht, andere Gene zu reprimieren, ist nicht eindeutig bewiesen worden. Der Phänotyp von *snail* kann bisher nicht erklärt werden.

Das einzige andere zygotisch exprimierte Gen, das eine nachgewiesene Rolle während der Ventralfurchenbildung hat, ist *folded gastrulation*. *folded gastrulation* ist sowohl in der Mesodermanlage als auch in der posterioren Mitteldarmanlage des Embryos exprimiert (Abb. 2.16). Embryonen, denen die Aktivität von *folded gastrulation* fehlt, haben in beiden Bereichen Defekte : Im Bereich der hinteren Mitteldarmanlage findet keine Invagination statt. Die Keimstreifausstreckung ist massiv gestört und die Ausbildung des Darms wird verhindert, was die Letalität der Mutation erklärt (Costa et al., 1994). Im Bereich des Mesoderms ist der Phänotyp weniger drastisch. Die Invagination des Mesoderms ist in *folded gastrulation*-Mutanten deutlich gestört. Sie erfolgt mit Verzögerung und weist gegenüber der Ventralfurchenbildung im Wildtyp ein deutlich geringeres Maß an Koordination auf. Dennoch gelangt das gesamte Mesoderm auch in *folded gastrulation*-Mutanten

letztendlich ins Innere des Embryos. Auch die Expression mesodermaler Marker findet statt.

*folded gastrulation*-Mutanten, in denen mit Hilfe eines Transgens *folded gastrulation* im Bereich der hinteren Mitteldarmanlage exprimiert wird, entwickeln einen normalen Darm. Das Mesoderm entwickelt sich in solchen Embryonen nach der gestörten Invagination normal weiter, obwohl *folded gastrulation* dort nicht exprimiert ist. Die Embryonen überleben und es entwickeln sich fertile Fliegen (Maria Leptin, unveröffentlicht).

*folded gastrulation* hat demnach zwar eine Funktion während der Ventralfurchenbildung, diese ist aber nicht essentiell. In der posterioren Mitteldarmanlage hingegen ist die Aktivität von *folded gastrulation* notwendig (Costa et al., 1994).

*folded gastrulation* ist ein Zielgen von *twist*. Damit ist *folded gastrulation* neben *snail* das einzige Zielgen von *twist*, von dem nachgewiesen ist, daß es notwendig für eine normale Ventralfurchenbildung ist. Die Primärsequenz von *folded gastrulation* läßt darauf schließen, daß es sich bei *Folded Gastrulation* um ein kleines Protein handelt, das von den Zellen, in denen es exprimiert wird, sezerniert wird. Dies ist in Einklang mit Antikörperfärbungen gegen *Folded Gastrulation* (Costa et al., 1994; Morize et al., 1998).

Nach der Invagination des Mesoderms spielen andere zygotisch exprimierte Gene für die weitere Morphogenese eine wichtige Rolle. *dof* und *heartless* (einer der beiden Drosophila FGF-Rezeptoren) sind nach der Invaginationsphase notwendig für die nachfolgende Ausbreitung des Mesoderms auf dem darunterliegenden Ektoderm (Vincent et al., 1998). Die Protein-Phosphatase *Cdc25<sup>string</sup>* löst in dieser Phase Zellteilungen im Mesoderm aus (Edgar and O'Farrell, 1989). Alle drei Gene, *dof*, *heartless* und *Cdc25<sup>string</sup>* sind bereits vor der Ventralfurchenbildung in der Mesodermanlage exprimiert und werden von *twist* aktiviert (Edgar et al., 1994; Vincent et al., 1998) .

## II) Maternale Faktoren

Das Gen *dorsal* und die Mitglieder der dorso-ventralen Gruppe (die Gene, die an der Kaskade beteiligt sind, die die dorso-ventrale Achse spezifiziert) sind notwendige Maternaleffektgene, die festlegen, wo die Mesodermanlage entsteht.

Darüber hinaus wurden auch Maternaleffektgene identifiziert, die eine wichtige Funktion während der Morphogenese der Mesodermanlage haben. Für die Ventralfurchenbildung sind mehrere von Bedeutung: Dazu gehören *concertina*, *RhoGEF2* und *dCtBP*.

*concertina* kodiert für die alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins. Embryonen, die mutant für *concertina* sind, zeigen den identischen Phänotyp wie Embryonen, die mutant für *folded gastrulation* sind. In Embryonen von Müttern, die homozygot mutant für *concertina* sind, findet keine Invagination der posterioren Mitteldarmanlage statt. Die Ventralfurchenbildung ist gestört, aber wie in *folded gastrulation*-Mutanten, gelangt das Mesoderm auch bei ihnen mit Verzögerung in das Innere des Embryos. Dieser Phänotyp und das Wissen, daß heterotrimere G-Proteine meist an Transmembran-Rezeptoren gekoppelt sind, legten den Schluß nahe, daß *folded gastrulation* und *concertina* Teile eines Signaltransduktionsweges sind, der sowohl in der Ventralfurchenbildung als auch in der Mitteldarmmorphogenese eine wichtige Rolle spielt (Parks and Wieschaus, 1991). In diesem Szenario ist *folded gastrulation* der Ligand für einen bisher nicht identifizierten Rezeptor, der an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt ist, dessen alpha-Untereinheit von *Concertina* gebildet wird (Abb. 1.12).

*RhoGEF2* kodiert für einen Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF), der vermutlich spezifisch mit Rho-GTPasen interagiert (Barrett et al., 1997; Häcker and Perrimon, 1998). GEF aktivieren GTPasen indem sie bewirken, daß die GTPase in ihrer inaktiven Form von GDP getrennt wird. Embryonen, die mutant für *RhoGEF2* sind, zeigen während der Gastrulation mehrere Defekte. Keimstreifausstreckung, Invagination der posterioren Mitteldarmanlage und Ventralfurchenbildung finden in solchen Embryonen nicht statt. Eine genauere Analyse zeigte, daß die für die Invaginationen typischen Zellformänderungen nicht beobachtet werden können. Außerdem findet die für die Zellformänderungen charakteristische Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts nicht statt. Die Expression einer dominant-negativen Form

von Rho1 zeigte ähnliche Effekte wie die Verlustmutation von RhoGEF2 (Barrett et al., 1997; Häcker and Perrimon, 1998). Daher ist vermutlich die GTPase Rho1 der vorrangige Interaktionspartner von RhoGEF2. Ein eindeutiger Nachweis für die Verbindung von RhoGEF2 zu Rho1 steht jedoch noch aus. In Frage gestellt wurde die Interaktion zwischen RhoGEF2 und Rho1 jedoch durch Experimente, in denen Mutanten analysiert wurden, in denen Rho1 zygotisch gar nicht und maternal stark reduziert exprimiert ist. Embryonen dieses Genotyps wiesen keine Gastrulationsdefekte auf, zeigten allerdings Defekte bei der Zellularisierung (Magie et al., 1999).

Möglicherweise besteht eine Verbindung von der postulierten *folded gastrulation/concertina*-Signaltransduktionskaskade zu RhoGEF2/Rho1.

In Ovarien von Müttern, die homozygot mutant für *concertina* sind, führt eine gleichzeitige Reduzierung der Gendosis von Rho1 zu Defekten im Aktin-Zytoskelett (Magie et al., 1999).

Ein weiterer maternaler Faktor, der möglicherweise für die Steuerung der Ventralfurchenbildung relevant ist, ist dCtBP, das Drosophila-Homolog von CtBP (Chinnandurai, 2002). Dafür spricht, daß dCtBP in einem Screen für Maternaleffektgene mit zusätzlicher essentieller zygotischer Expression gefunden wurde, wobei der gleichzeitige Verlust von maternaler und zygotischer Expression von dCtBP zu Gastrulationsdefekten führte (Perrimon et al., 1996).

CtBP wurde ursprünglich als Protein identifiziert, das an das C-terminale Ende des Adenovirus-Proteins E1A bindet und dessen onkogene Wirkung negativ moduliert. Inzwischen wurden Homologe von CtBP in einem breiten Spektrum von Arten gefunden. Dieses schließt Vertebraten, Invertebraten und auch Pflanzen mit ein. Es zeigte sich, daß CtBP hochkonserviert ist und seine Funktion dadurch ausübt, daß es als Co-Repressor mit anderen Repressoren über ein konserviertes Bindungsmotiv interagiert. Je nach Promotor-Kontext rekrutiert CtBP Histon-Deacetylasen oder nicht (Chinnandurai, 2002).

In Drosophila wurden mehrere Repressoren identifiziert, die mit CtBP interagieren und gemeinsam ihre repressive Funktion ausüben. Dazu gehören Knirps, Krüppel und Suppressor of Hairless. Weitere Repressoren wie Hairy, Brinker, Zfh-1 und Tramtrack69 zeigen ebenfalls Interaktionen mit dCtBP (Chinnandurai, 2002).

Ein weiterer Hinweis dafür, daß dCtBP eine Rolle bei der Ventralfurchenbildung spielen könnte, ist das Ergebnis, daß auch Snail mit dCtBP interagiert und die Aktivität von dCtBP für die Funktion von Snail als Repressor notwendig ist (Nibu et al., 1998a; Nibu et al., 1998b).

Außer den genetisch identifizierten maternalen Faktoren, die eine wichtige Rolle für die Gastrulation spielen, gibt es noch eine Reihe von anderen Proteinen, die wichtig für die zellulären Prozesse während der Gastrulation sind. Von diesen ist bekannt, daß sie in anderen Untersuchungssystemen für Zellformänderungen notwendig sind. Dazu gehören insbesondere Zytoskelett-Proteine wie Aktin und die zytoplasmatische Form von Myosin (cMyosin). Wie oben erwähnt, ist bereits früher vorgeschlagen worden, daß die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Voraussetzung für die Zellformänderungen ist (Leptin, 1995; Sweeton et al., 1991). Eine Beobachtung, die auf eine Rolle von cMyosin für die Ventralfurchenbildung schließen läßt, ist, daß unmittelbar vor Einsetzen der Zellformänderungen cMyosin in den mesodermalen Zellen von basal nach apikal verlagert wird (Hunter and Wieschaus, 2000; Leptin, 1991a). Ähnliche Ergebnisse stammen von Untersuchungen der Lokalisation von cMyosin im Primordium der hinteren Mitteldarmanlage. Auch dort wird cMyosin unmittelbar vor der Invagination der Zellen von basal nach apikal verlagert (Young et al., 1991). Es besteht daher eine klare Korrelation zwischen der Änderung der subzellulären Lokalisation von cMyosin und bevorstehenden Zellformänderungen.

Funktionelle Studien stehen noch aus. Es existiert mittlerweile eine dominant-negative Form von cMyosin, aber die Auswirkung der Expression im Mesoderm wurde bisher nicht untersucht (Brand, EDRC 2001). In welcher funktionellen Beziehung die Veränderungen in der Zytoskelett-Struktur zu den für die Invagination des Mesoderms notwendigen Zellformänderungen stehen, ist bisher nicht geklärt.

Eine zusammenfassende Darstellung der bisher bekannten Genprodukte und ihrer vermutlichen Wirkungsorte sind in Abb. 1.12 dargestellt.



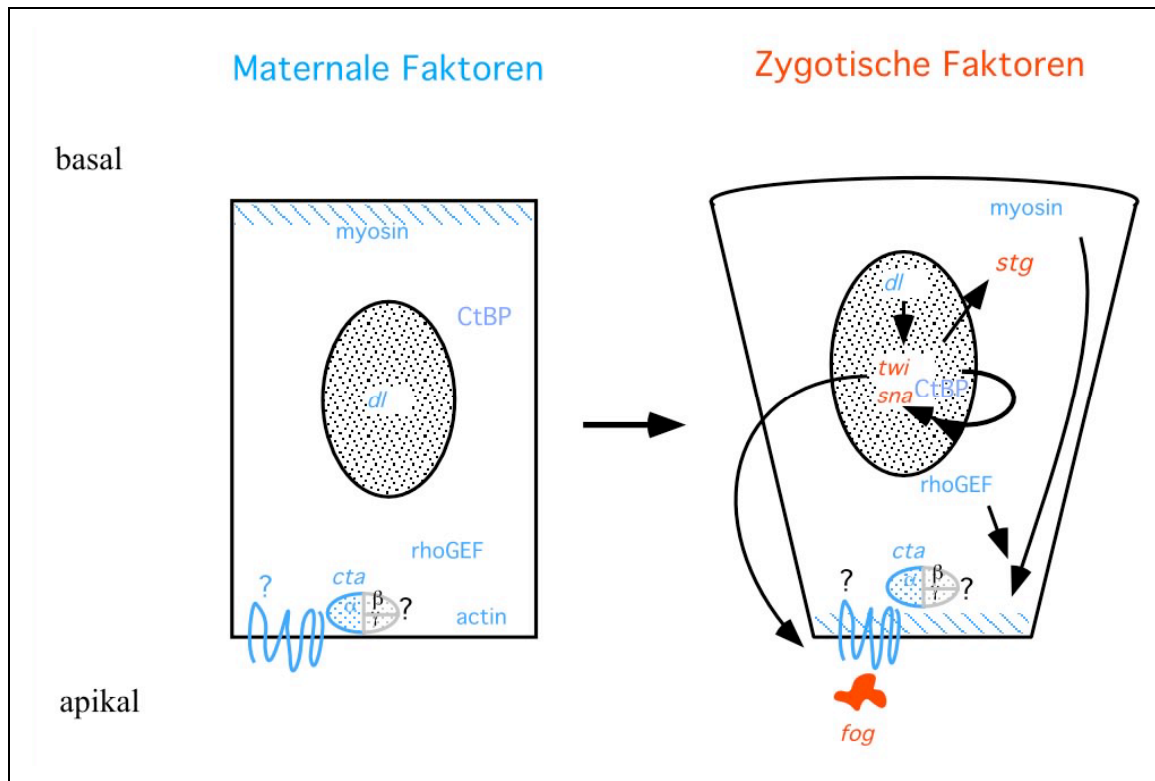


Abb. 1.12: Die bekannten maternalen und zygotischen Faktoren, die an der Steuerung der für die Ventralfurchenbildung notwendigen Zellformänderungen beteiligt sind. Das Schema schließt postulierte, aber bisher nicht identifizierte Faktoren ("??") mit ein. Abbildung von Maria Leptin, leicht verändert.

### 1.2.3 Einordnung der Gastrulation in den Entwicklungszusammenhang in *Drosophila melanogaster*

#### Die Teilungsanomalie der Mitotischen Domäne 10 (Mesoderm)

Die Gastrulationsbewegungen in *Drosophila* beginnen, wenn die Embryonen etwa 2 Stunden und 40 Minuten alt sind (bei 25°C). In dieser Phase der Entwicklung finden im Embryo schnell aufeinanderfolgend und teilweise parallel mehrere grundlegende Prozesse statt:

- die Zellularisierung
- die Umschaltung von maternaler auf zygotische Kontrolle der Entwicklung
- der Übergang von synchronen Kern-Teilungszyklen zu asynchronen Teilungen von Zellen

### - der Beginn der Morphogenese des Embryos

Nach dem 13. Teilungszyklus (s. unten) besteht der Embryo (abgesehen von den Vorläuferzellen der Keimbahn, den Polzellen) immer noch aus einer einzigen Zelle, die mittlerweile mehrere Tausend Kerne beherbergt. Der 14. Teilungszyklus beginnt mit einer langen Interphase, in deren Verlauf der Embryo eine Umwandlung vom Synzytium zum Blastoderm erfährt. Es werden Zellmembranen synthetisiert und zwischen den nebeneinander an der Peripherie aufgestellten Kernen eingefügt, wodurch Zellen entstehen (Foe et al., 1993). Sobald die *Zellularisierung* auf der ventralen Seite des Embryos abgeschlossen ist, kommt es dort zu den Zellformänderungen, die die Venturfurchenbildung einleiten (Costa et al., 1993; Leptin and Grunewald, 1990; Sweeton et al., 1991). Obwohl vermutet wurde, daß das Ende der Zellularisierung möglicherweise als auslösendes Signal für die Zellformänderungen in der Mesodermanlage wirken könnte, konnte gezeigt werden, daß Mutationen, die die Zellularisierung betreffen, das Einsetzen der Venturfurchenbildung nicht verzögern (Straub et al., 1996).

Ein Prozess, der unmittelbar vor der Gastrulation einsetzt, ist der Übergang von maternaler zu zygotischer Steuerung der Entwicklung. In dieser Phase werden viele maternale Faktoren abgebaut und viele zygotische Gene zum ersten mal aktiviert. Zwar gibt es auch vorher schon zygotische Genexpression, aber diese betrifft nur wenige Gene (Martinez -Arias and Bate, 1993). Die Umschaltung von maternaler auf zygotische Kontrolle stellt die Voraussetzung für die nachfolgende Serie von morphogenetischen Prozessen dar, denn die meisten dieser Prozesse werden von zygotisch exprimierten Genen gesteuert. Im Mesoderm selbst ist dieser Übergang durch die Aktivierung von *snail* und *twist* durch Dorsal gekennzeichnet.

Das dritte Ereignis, das mit der Gastrulationsphase zusammenfällt, ist die Änderung der Zellteilungsmuster. Bis zur Zellularisierungsphase finden im Embryo nur synchrone Kernteilungen statt. 13 mal teilen sich die Kerne im Embryo, wobei die letzten Teilungen bereits an der Peripherie des Embryos stattfinden, wohin die Kerne nach dem 9. Teilungszyklus gewandert sind. Die Zellularisierung fällt zeitlich mit der Interphase des 14. Teilungszyklus zusammen. Sobald die Zellularisierung abgeschlossen ist und die Gastrulationsbewegungen beginnen, wird der G<sub>2</sub>—M-Übergang des 14. Teilungszyklus initiiert (Foe et al., 1993). Im Gegensatz zu den

vorherigen Teilungszyklen teilen sich nun nicht mehr alle Zellen synchron (Edgar and O'Farrell, 1989; Foe et al., 1993). Die Teilungen erfolgen in kleinen, charakteristischen Gruppen von Zellen, den *mitotischen Domänen* (Abb. 1.13). Die mitotischen Domänen lassen sich als Gruppen von Zellen definieren, deren 14. Interphase gleich lang ist. Die Steuerung der Mitosen ab Teilungszyklus 14 steht ebenfalls unter Kontrolle des zygotischen Genoms (Edgar and Datar, 1996; Edgar and O'Farrell, 1989).

Das Erscheinen der mitotischen Domänen ist räumlich und zeitlich präzise gesteuert, wobei die Festlegung der räumlichen Ausdehnung jeder mitotischen Domäne durch die Aktivität einer spezifischen Kombination zygotisch aktiver Gene kontrolliert wird. Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die an der anterior-posterioren Achsenbildung und der Musterbildung entlang der dorso-ventralen Achse beteiligt sind (Edgar et al., 1994). Da die Expression dieser frühen zygotisch exprimierten Gene, die auch die Ausbildung der mitotischen Domänen kontrollieren, einem sowohl zeitlich als auch räumlich präzise geregelten Programm unterliegt, gilt dies auch für die mitotischen Domänen. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Domänen folgt daher einem strengen, stereotypen Muster. Wegen der hohen Reproduzierbarkeit dieses Musters wurden die mitotischen Domänen entsprechend der Reihenfolge, in der sie in Teilung gehen, als Mitotische Domäne Nr.1 (MD1) bis MD25 bezeichnet (Foe, 1989). In einer graphischen Projektion auf die Oberfläche eines Embryos sind diese als zweimal 25 bilateral-symmetrisch angeordnete Regionen darstellbar (Abb. 1.13).

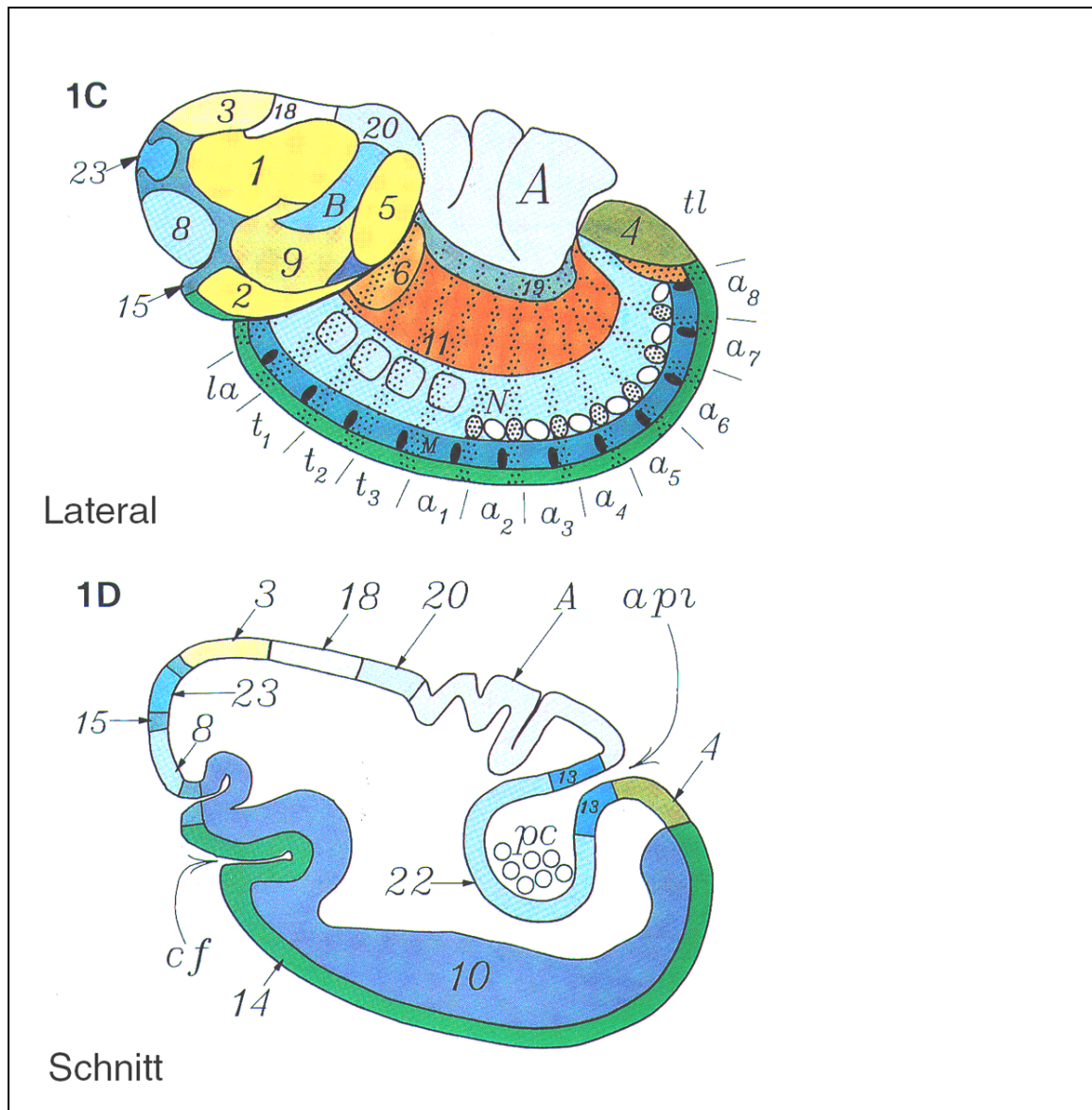


Abb. 1.13: Schematische Darstellung der mitotischen Domänen. Die Zahlen entsprechen der Numerierung der Domänen. Die Abbildung zeigt einen Embryo in der frühen Phase der Keimstreifenausstreckung, wenn die Invagination des Mesoderms bereits komplett abgeschlossen ist. Erst dann teilt sich in Wildtyp-Embryonen das Mesoderm (MD10). Nach Foe, V., '89 verändert.

Da die genetische Kontrolle der Zellteilungen in den mitotischen Domänen im Verlauf meiner Arbeit bedeutsam wurde, gehe ich auf einige Aspekte dieser Thematik im folgenden näher ein.

Die Teilungen der Zellen innerhalb der mitotischen Domänen werden dadurch ausgelöst, daß genau in den Bereichen, in denen die Teilungen stattfinden, kurz vorher die Proteinphosphatase Cdc25<sup>string</sup> exprimiert wird (Edgar et al., 1994; Edgar and O'Farrell, 1989). Cdc25<sup>string</sup> ist das Zielgen, dessen Expression von den zygotisch

exprimierten Genen der Musterbildungssysteme kontrolliert wird, was zur Festlegung der mitotischen Domänen führt. Cdc25<sup>string</sup> aktiviert die Kinase Cdc2 durch Entfernen von zwei inhibitorischen Phosphatresten. Aktiviertes Cdc2 wiederum löst dann durch Phosphorylierung spezifischer Substrate jene Ereignisse aus (Kondensation der Chromosomen, Auflösung der Kernmembran, Ausbildung der mitotischen Spindel, etc.), die in ihrer Gesamtheit als Mitose bezeichnet werden.

Die Expression von Cdc25<sup>string</sup> spiegelt dabei sowohl räumlich als auch in der zeitlichen Abfolge das spätere Muster der mitotischen Domänen genau wieder. Dies gilt für alle mitotischen Domänen mit der Ausnahme von MD10. Bei MD10 handelt es sich um die Mesodermanlage. Sie ist die zehnte Domäne, die sich teilt, nämlich dann, wenn die Mesoderminvagination abgeschlossen ist und das Mesoderm mesenchymalen Charakter annimmt. In situ-Hybridisierung mit einer Cdc25<sup>string</sup>-spezifischen Sonde zeigt jedoch, daß MD10 die erste Domäne ist, in der Cdc25<sup>string</sup> exprimiert wird. Dadurch ist der zeitliche Abstand zwischen Cdc25<sup>string</sup> Expression und Teilungsaktivität in MD10 größer als in jeder anderen Domäne. Warum das Mesoderm sich anders verhält als die anderen mitotischen Domänen, ist unklar. Würde das Mesoderm der Kinetik der anderen Domänen folgen, so müßte es die erste Domäne sein, in der Zellteilungen stattfinden (Foe et al., 1993). Überexpressionsexperimente mit Cdc25<sup>string</sup> haben zu der Vermutung geführt, daß bei einer normalen (d.h.: sich ähnlich wie die anderen mitotischen Domänen verhaltenden) Teilungskinetik von MD10 die Zellteilungen und die Invagination des Mesoderms gleichzeitig stattfänden. Experimente mit einer Hitzeschock-induzierbaren Form von Cdc25<sup>string</sup>, in denen Cdc25<sup>string</sup> unmittelbar vor der Ventralfurchenbildung ubiquitär exprimiert wurde, führten zu schweren Gastrulationsdefekten. Von allen morphogenetischen Bewegungen war die Invagination des Mesoderms dabei die einzige, die durch die ubiquitäre Expression von Cdc25<sup>string</sup> gestört wurde. Es wurde daher spekuliert, daß der Umstand, daß in MD10 die Teilungen erst nach der Invagination stattfinden, eine Anpassung an morphogenetische Erfordernisse ist (Foe et al., 1993).

### Offene Fragen

Viele Fragen, deren Beantwortung zu einem vollen Verständnis der Ventralfurchenbildung beitragen würden, sind bisher ungelöst.

Insbesondere ist völlig unklar, welche zygotischen Gene -außer *folded gastrulation*- von *snail* und *twist* reguliert werden müssen, um die Invagination der Mesodermanlage zu kontrollieren. Ebenso wenig ist klar, welche Prozesse von den unbekannten Zielgenen gesteuert werden. Ansätze, die theoretisch zur Lösung dieses Problems hätten führen können, hat es gegeben. Zahlreiche genetische Screens, deren Ziel es war, zygotisch exprimierte Gene zu identifizieren, die essentiell für die Embryonalentwicklung insgesamt sind, haben keine weiteren Gene aufgedeckt, die notwendig für die Invagination des Mesoderms sind. Viele dieser Screens waren sättigend. Die wahrscheinlichste Erklärung für die fehlende Identifizierung weiterer Gene, die notwendig für die Ventralfurchenbildung sind, ist, daß es gar keine weiteren Gene gibt, die ähnlich notwendig sind wie *snail* und *twist*. Die Zielgene von *snail* und *twist* sind möglicherweise nicht essentiell, sondern steuern nur Teilprozesse oder sind in ihrer Funktion redundant. Vermutlich hat der Ausfall einzelner Zielgene von *snail* und *twist* deshalb keine vergleichbaren Phänotypen wie es in *snail*- und *twist*-Mutanten der Fall ist. Der Phänotyp von *folded gastrulation* ist ein gutes Beispiel dafür. Wie das Ergebnis der Rettung des mutanten Mitteldarm-Phänotyps in *folded gastrulation*-Mutanten zeigt, ist der mutante Mesodermphänotyp nur ein vorübergehendes Ereignis ohne weitere sichtbare Konsequenzen für die Entwicklung des Mesoderms (M. Leptin, unveröffentlicht). Gäbe es den mutanten Mitteldarmphänotyp von *folded gastrulation*-Mutanten nicht, das zeigen die Rettungsexperimente, wäre der Ausfall der Funktion von *folded gastrulation* nicht letal und *folded gastrulation* wäre auf genetischem Weg vermutlich nicht identifiziert worden und möglicherweise bis heute unbekannt.

Auch ein molekularer Screen hat - nach dem heutigen Stand der Analyse - keine neuen Gene identifiziert, die für die Ventralfurchenbildung notwendig sind (wohl aber andere, die für spätere Prozesse der Mesodermentwicklung von Bedeutung sind (Casal and Leptin, 1996)). Dafür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Eine mögliche Erklärung ist, daß bei der gewählten Methode (subtraktive Hybridisierung) solche Gene, die sowohl im Mesoderm als auch im Ektoderm exprimiert sind, nicht

identifiziert werden. Es ist nicht auszuschließen, daß Gene, die an der Ventralfurchenbildung beteiligt sind, unter Kontrolle anderer Gene auch im Ektoderm exprimiert sind. Dies würde erklären, warum beispielsweise *folded gastrulation* im genannten Screen nicht gefunden wurde. Die andere mögliche Erklärung ist, daß dieser Screen vermutlich nicht sättigend war. Dafür spricht, daß einige Gene, von denen bekannt ist, daß sie im Mesoderm exprimiert sind, beispielsweise *zfh-1*, nicht identifiziert wurden. Es ist daher möglich, daß die Identifikation von unbekannten Genen, die eine Rolle bei der Ventralfurchenbildung spielen, ebenfalls mißlang.

Die Frage, die sich aus diesen Ergebnissen zwangsläufig ergibt, lautet: Wie lassen sich Zielgene von *snail* und *twist* identifizieren, wenn deren Verlustmutation nur subtile, vorübergehende Phänotypen zur Folge hat? Es ist mit genetischen Methoden möglich, Verlustmutationen zu erzeugen, die die gesuchten Gene betreffen. Die Schwierigkeit bestand bisher aber in der Identifizierung solcher Gene, deren mutanter Phänotyp nur transiente und subtile Phänotypen verursacht. Bei der Planung eines geeigneten Screens mußte also ein Testsystem gefunden werden, das es möglich macht, die zu erwartenden schwachen Phänotypen zu identifizieren. Der beste Weg, schwache Phänotypen während der Ventralfurchenbildung zu identifizieren, besteht darin, in Mutanten die Ventralfurchenbildung selbst zu untersuchen. Dies ist wegen der Kürze des Prozesses und, weil es sich ja voraussichtlich um subtile Phänotypen handeln würde, allerdings aufwendig- insbesondere, wenn man es mit einem Mutagenese-Screen vergleicht, der auf durch die Mutation bedingter Letalität basiert. Eine EMS-Mutagenese kam daher nicht in Frage, weil zu viele Chromosomen untersucht werden müßten (siehe dazu auch: Einleitung zu Kapitel 2.1).

Um die Zahl der zu analysierenden Fliegenstämme und damit den Aufwand des Screens zu begrenzen, entschied ich mich dafür, mit einer klassischen Methode nach Genen zu suchen, die eine Rolle während der Ventralfurchenbildung spielen. Es handelt sich dabei um einen sogenannten Defizienzen-Screen (geht auf eine Idee zurück von: Poulson, 1937, PNAS). Dabei wird eine Sammlung von Fliegenstämmen, die definierte Deletionen tragen, die in der Summe eine möglichst hohe Abdeckung des Genoms ermöglichen, untersucht. Die gewählte Testmethode, mit der auch schwache Phänotypen sichtbar gemacht werden sollten, bestand in Doppel-Antikörpermarkierungen, die eine Beurteilung der frühen Morphogenese der

Embryonen möglich machen (siehe Kapitel 2.1). Auf diese Weise - geringe Anzahl von zu untersuchenden Stämmen (rund 200) bei gleichzeitiger eingehender Analyse der frühen Morphogenese - bestand aus meiner Sicht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Aufwand und Empfindlichkeit der gewählten Testmethode.

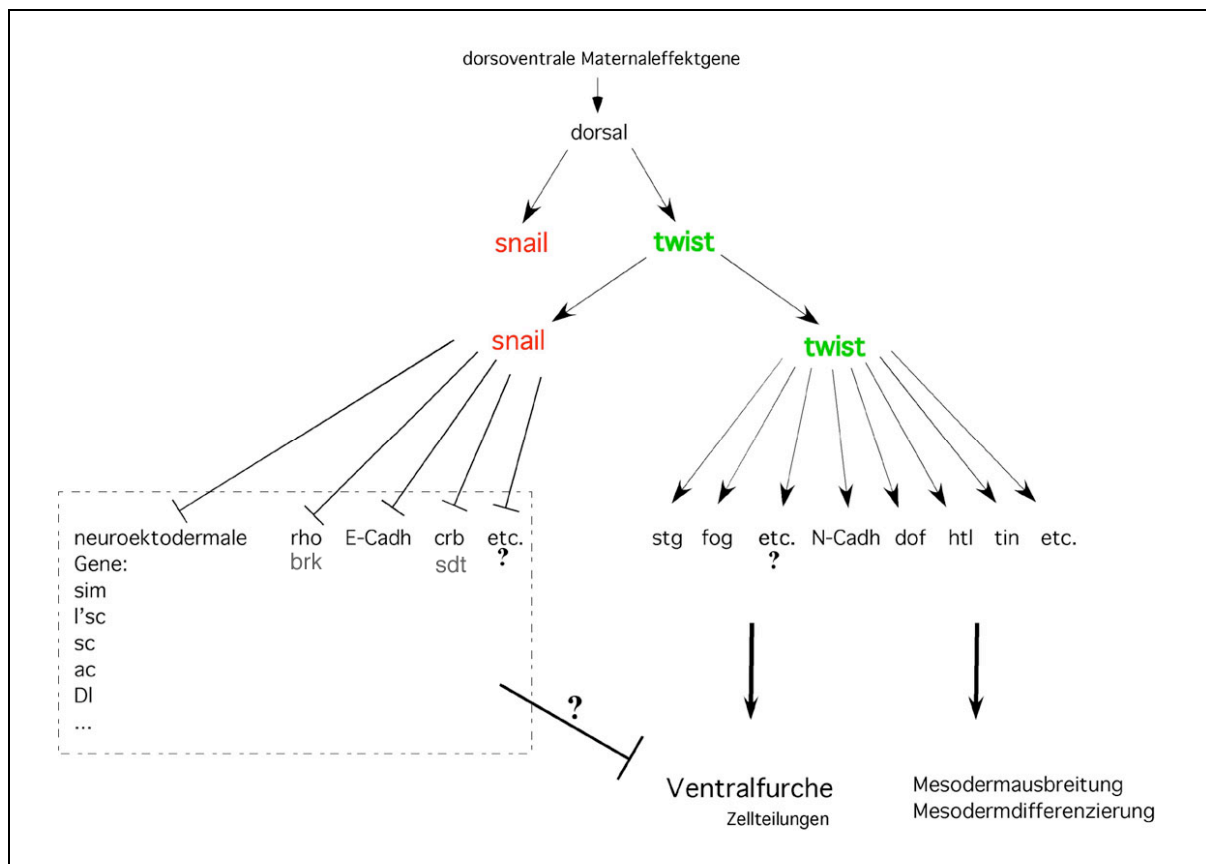
Eine weitere offene Frage ist, wie die Vernetzung der zygotischen Gene *snail* und *twist* mit den für die Gastrulation notwendigen maternalen Faktoren Rho1 und RhoGEF2 oder auch cMyosin aussieht. Auch ist bisher nicht klar, ob es weitere maternale Faktoren gibt, die für eine normale Ventralfurchenbildung notwendig sind. Und schließlich muß enträtselt werden, welche Bestandteile des Zytoskeletts für die Zellformänderungen notwendig sind, und auf welche Weise sie gebraucht werden.



## Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand in der Identifizierung neuer Loci, die an der Steuerung und Kontrolle der Ventralfurchenbildung beteiligt sind. Es sollte versucht werden, solche Gene mit genetischen Methoden zu finden. Dazu sollte ein Screen angelegt werden, der es insbesondere ermöglichte, auch schwache mutante Phänotypen zu identifizieren. Die Charakterisierung der aufgefundenen Gene sollte dazu beitragen, zu verstehen, welche Zielgene von *snail* und *twist* reguliert werden und welche Prozesse von den beiden Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden, damit es zur Invagination der Mesodermanlage kommt.

Eine schematische Darstellung, wie sich die genetische Kontrolle der Gastrulation von *Drosophila* heute darstellt, ist in Abb. 1.14 gegeben. Die genauen Mechanismen der Gastrulationskontrolle sind jedoch nach wie vor nicht erklärt. Ziel meiner Arbeit war es zu versuchen, neue Erkenntnisse zu gewinnen, die dazu beitragen würden, das Schema zu komplettieren.



## Kap. 2 Ergebnisse

### 2.1. Defizienzenscreen zur Identifizierung neuer an der Ventralfurchenbildung beteiligter Gene

Das erste Ziel meiner Arbeit war die Identifizierung neuer genetischer Loci, die für die Ventralfurchenbildung notwendig sind. Verlustmutationen für *folded gastrulation* oder die Reduzierung der Aktivität von *snail* führen zu schwachen und nur vorübergehenden Störungen der Ventralfurchenbildung. Es mußte daher damit gerechnet werden, daß andere an der Ventralfurchenbildung beteiligte Gene im Falle einer Mutation ebenfalls nur schwache Phänotypen aufweisen. Die erste Überlegung betraf aus diesem Grunde die Wahl der am besten geeigneten Methode.

Die Entscheidung für eine genetische Methode wurde bereits in der Einleitung erläutert. Eine kurzzeitige Störung der Invagination des Mesoderms läßt nicht notwendigerweise erwarten, daß mit Letalität gerechnet werden muß. Als sicheres Kriterium für einen genetischen Screen kam nur der Ventralfurchenbildungsphänotyp selbst in Frage. Daraus ergibt sich, daß der Aufwand, den man betreiben muß, um subtile Gastrulationsphänotypen zu finden, hoch ist. Man muß für die Auffindung etwaiger Phänotypen sehr viele Embryonen aus einem sehr kurzen Entwicklungsabschnitt sammeln und diese detailliert studieren.

Wenn man genomweit nach Genen sucht, die für einen bestimmten Prozess von Bedeutung sind, dann entscheidet man sich in den meisten Fällen für eine chemische Mutagenese (Nüsslein-Volhard et al., 1984), die Durchsicht von Stämmen mit kartierten P-Element-Insertionen oder sogar beides (Greenspan, 1997; Roberts, 1998). Bei einer EMS-Mutagenese werden üblicherweise rund 5000 mutagenisierte Chromosomen pro Chromosomenarm analysiert, was bei einem Screen, der die Autosomen in *Drosophila* berücksichtigt, bedeuten würde, daß man 20000 Chromosomen auswerten müßte. Letalität (bei EMS-Mutagenesen für die Analyse von embryonalen Entwicklungsprozessen in den meisten Fällen der Selektionsfaktor) kann bei Mutation eines für die Ventralfurchenbildung relevanten Locus nicht vorausgesetzt werden. Daher müßte man nach der Mutagenisierung erst einmal Stämme von allen Nachkommen, das

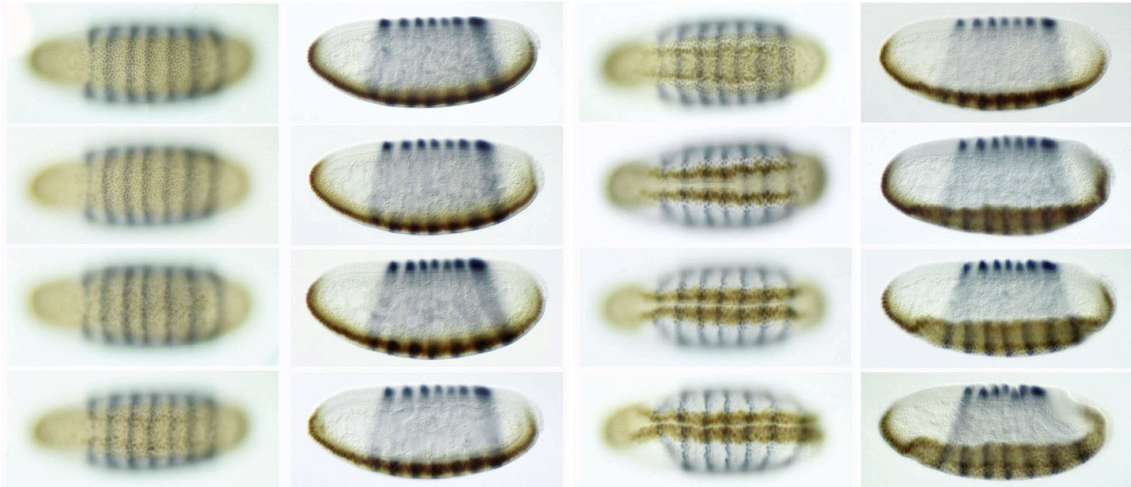
heißt also rund 20000 Linien etablieren. Dies wäre notwendig, damit von jedem der zu analysierenden Stämme ausreichende Mengen an Embryonen gesammelt werden könnten. Anders wäre eine sorgfältige Analyse nicht durchführbar. Selbst wenn man 10 Stämme pro Tag auswerten würde (was sehr viel wäre bei der ausgewählten Testmethode, s.u.), wäre man für mindestens 5 bis 6 Jahre nur damit beschäftigt, die Kandidaten aufzufinden. Diese Schätzung betrifft nur die Arbeit am Screen selbst. Dazu käme noch der materielle und logistische Aufwand viele Tausend Stämme über Jahre hinweg zu halten. Die weitergehende Analyse, die die genaue Kartierung der Mutation und die Identifizierung und Genetik der betroffenen Gene umfaßt, ist in diese Schätzung ebenfalls nicht eingeschlossen.

Bei Stämmen mit P-Element-Insertionen würde man Probleme wie Kartierung und Klonierung von für die Ventralfurchenbildung notwendigen Gene reduzieren. Die gängigen P-Element-Sammlungen umfassen aber auch noch einige Tausend Stämme (Bloomington Stock Center, USA; European Stock Center, Szeged, Ungarn). Daher gelten auch hier die gleichen Argumente wie gegen eine klassische EMS-Mutagenese: Der Aufwand wäre immer noch zu hoch. Hinzu kommt, daß der Sättigungsgrad von P-Element-Mutagenesen geringer ist als bei EMS-Mutagenesen, unter anderem deshalb, weil P-Elemente Präferenzen zeigen was den Insertionsort betrifft.

Klassische Mutagenesen stellten daher in meinen Augen nicht die Methode der Wahl dar. Es erschien wichtig, mit einer kleinen Anzahl von Stämmen arbeiten zu können. Ich entschied mich dafür, eine Sammlung von Stämmen mit definierten Deletionen durchzusehen, die in ihrer Gesamtheit eine möglichst vollständige Abdeckung des Genoms ergeben sollten. Auf diese Weise werden nicht direkt einzelne Gene, sondern zunächst einmal Regionen im Genom aufgefunden. Man erreicht so mit vergleichsweise geringem Aufwand eine Primäranalyse, deren Ergebnisse dann über das weitere Vorgehen entscheiden. Gefundene Regionen können nachfolgend weiter untersucht werden, um eine feinere Kartierung zu erreichen bis hin zur Identifizierung der aufgedeckten Gene selbst.

Ein solcher sogenannter *Defizienzen-Screen* (Greenspan, 1997; Poulson, 1937) bietet den Vorteil, daß die Anzahl der zu untersuchenden Stämme überschaubar ist (rund 200 für die Autosomen). Auf die zu untersuchenden Embryonen jedes Stammes kann ausreichend

Zeit verwendet und der Aufwand insgesamt begrenzt werden. Dies entsprach meiner Ansicht nach am besten den aus der genannten Fragestellung resultierenden Ansprüchen an eine genetische Untersuchungsmethode.



**Abb. 2.1:** Gastrulation in *Drosophila*. Gezeigt ist eine Serie von aufeinanderfolgenden Stadien in Wildtyp-Embryonen. Links sind Ventralansichten gezeigt, jeweils daneben derselbe Embryo im optischen Längsschnitt. Die Sequenz zeigt die gesamte Phase der Ventralfurcbildung und umfaßt etwa 15 Minuten. Mit Hilfe der Doppelmarkierung lassen sich alle morphologischen Prozesse im Ablauf genau erfassen. Braun: Antikörperfärbung gegen Twist, Blau: Antikörperfärbung gegen Even-Skipped.

### *Etablierung der Testmethode*

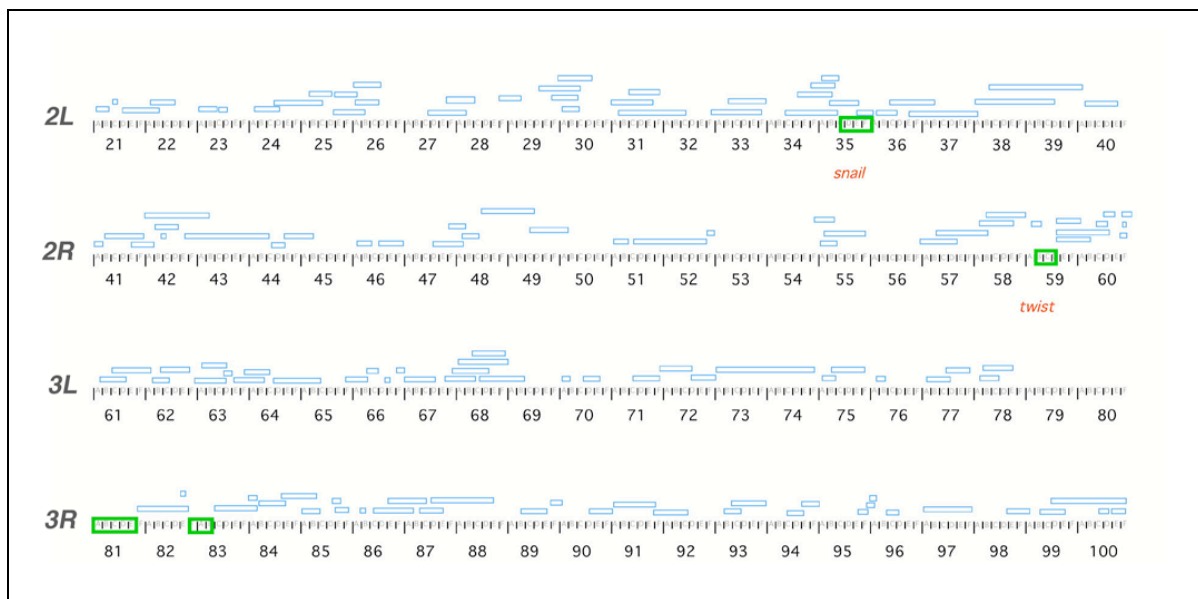
Die Empfindlichkeit der Testmethode entscheidet darüber, wie zuverlässig eventuell auftretende schwache Phänotypen detektiert werden können. Um transiente und schwache Phänotypen aufzufinden, war daher die präzise Begutachtung geeignet markierter Embryonen eine wichtige Voraussetzung. Dabei sollte die Methode zwei Voraussetzungen erfüllen:

- Sie mußte die zu untersuchenden morphologischen Prozesse gut sichtbar machen
- Es sollte möglich sein, die relevanten Prozesse und ihre etwaigen Störungen zeitlich gut auflösen zu können, was sowohl das Auffinden von mutanten Phänotypen als auch ihre Beschreibung und Untersuchung erleichtern würde. Mit zeitlicher Auflösung ist hierbei gemeint, die durch die Fixierung in verschiedenen Entwicklungsphasen arretierten

Embryonen so zu sortieren, daß man sie in eine Reihenfolge bringt, die aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien darstellt. Eine Markierung sollte dies erleichtern, sodaß man auch sehr eng aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien noch gut voneinander trennen kann. Die Notwendigkeit für diesen Anspruch wird deutlich, wenn man die Geschwindigkeit der frühen Morphogenese bedenkt: Die Invagination der Mesodermanlage ist innerhalb von rund 15 Minuten abgeschlossen.

Als Test-System für den Defizienzen-Screen wurde die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen die Proteine Twist und Even-skipped gewählt. Dies ist in Abb. 2.1 an Wildtypembryonen dargestellt. Dabei macht die Markierung mit Antikörpern gegen Twist die Bildung der Ventralfurche gut sichtbar. Die Markierung gegen Even-skipped hebt andere morphologische Prozesse wie die Bildung der Kopffalte und die Keimstreifausstreckung hervor und erleichtert eine gute zeitliche Auflösung der zu untersuchenden Prozesse. Durch diese Doppel-Markierung projiziert man gewissermaßen ein Koordinatensystem auf die Oberfläche des Embryos, mit dessen Hilfe alle wesentlichen durch die einsetzende Morphogenese verursachten Verformungen des Embryos gut sichtbar gemacht werden können. Dabei handelt es sich nicht um ein starres, sondern um ein dynamisches, weil zeitlich veränderliches Koordinatensystem. In der Frühphase der Gastrulation, die hier im Mittelpunkt steht, beruht die Verkrümmung des Koordinatensystems nur auf den in dieser Phase stattfindenden morphogenetischen Prozessen wie Bildung der Kopffalte, Ausstreckung des Keimstreifes oder der Invagination der Mesodermanlage. Andere als morphogenetisch bedingte Änderungen der Expressionsmuster von *twist* und *even-skipped* setzen erst im späten Verlauf der Keimstreifausstreckung ein, wenn die Invagination des Mesodermprimordiums längst abgeschlossen ist. Durch die zeitliche Veränderlichkeit des Twist/Even-skipped-Expressionsmusters werden die Prozesse der frühen Morphogenese nicht nur sichtbar gemacht, verschiedene dieser Prozesse lassen sich auch zeitlich miteinander korrelieren. Beispielsweise läßt sich die Position der posterioren Even-Skipped-Streifen, die sich mit dem Einsetzen der Keimstreifausstreckung ändert, sowohl mit der Invagination der posterioren Mitteldarmanlage als auch mit den verschiedenen Phasen der Invagination des Mesoderms in einen zeitlichen Zusammenhang bringen.

Ein wichtiges Ergebnis in diesem Zusammenhang war, daß in Wildtyp-Embryonen eine hohe Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Dynamik des Koordinatensystems beobachtet werden kann. Die in Abb. 2.1 gezeigte Sequenz zeigt eine Auswahl aufeinanderfolgender Stadien ausgewählter Embryonen. Schaut man sich unter Zuhilfenahme des *twist/even-skipped*- Koordinatensystems sehr viele solcher Wildtyp-Embryonen an, so stellt man fest, daß die zeitliche Abfolge der verschiedenen morphogenetischen Prozesse mit einer hohen Präzision reproduziert wird. Durch die Färbung definierte gleichartige Stadien weisen in engen Grenzen immer den gleichen Zustand der verschiedenen morphogenetischen Prozesse auf. Die in Abb. 2.1 zu sehende Sequenz von frühen Gastrulationsstadien konnte somit als Referenz für den durchzuführenden Screen verwendet werden.



**Abb.2.2:** Eine Karte der beiden großen Autosomen von *Drosophila melanogaster*. In blau sind die Kartierungen der für den Defizienzen-Screen verwendeten Deletionen abgebildet. In grün sind die Regionen hervorgehoben, die genetisch nicht einfach zugänglich sind und noch näher untersucht werden müssen.

### **2.1.1. Die Regionen, die als notwendig für einen ordnungsgemäßen Ablauf der Ventralfurchenbildung identifiziert wurden und die korrespondierenden Phänotypen**

Ein Überblick der für den Defizienzen-Screen verwendeten Stämme, bzw. der in den Stämmen deletierten genomischen Regionen ist in Abb. 2.2 zu sehen. Mit der verwendeten Sammlung von Deletionen wird eine Abdeckung des autosomalen Genoms von über 80% erreicht (geschätzt auf der Grundlage der physikalischen Kartierung der analysierten Deletionen; eine präzisere Angabe würde eine vorhergehende molekulare Kartierung der betreffenden Deletionen verlangen).

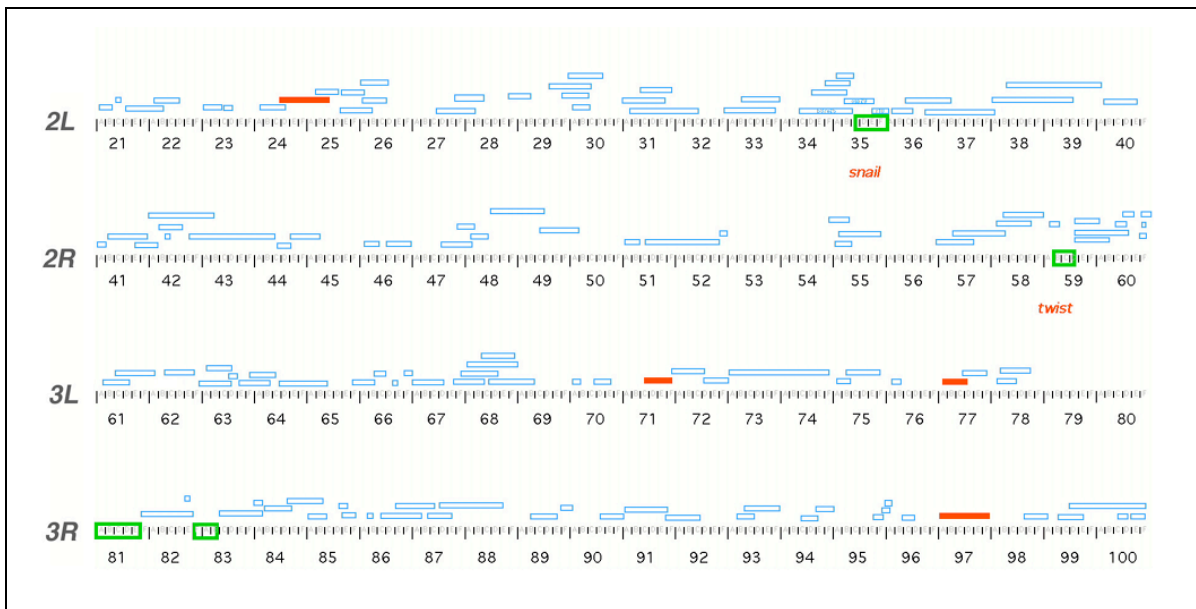
Die Beschränkung auf die Autosomen war möglich, weil von Eric Wieschaus und Mitarbeitern gezeigt wurde, daß auf den Heterosomen nur zwei für die frühe embryonale Entwicklung relevante Gene zu finden sind: *folded gastrulation* und *nullo* (Eric Wieschaus, nicht publiziert, persönliche Korrespondenz).

Die oben beschriebene Nutzung des *twist-even-skipped*- Koordinatensystems ist die Voraussetzung für die gewünschte zeitliche Auflösung bei der Begutachtung der frühen embryonalen Morphogenese. Die praktische Umsetzung sah knapp umrissen wie folgt aus:

Von jedem der ausgewählten Fliegenstämme mußten in ausreichender Zahl Embryonen der relevanten Entwicklungsphase (ca. 150 Minuten AED bei 27°C, empirisch ermittelt) als fixiertes Material zur Verfügung stehen. Dazu wurde von jedem Stamm Kurzablagen (60 bis 90 Minuten Legezeit) gesammelt, die entsprechend 90 bis 60 Minuten zur Weiterentwicklung inkubiert wurden, bis die Mehrzahl der Embryonen sich in der gewünschten Entwicklungsphase befanden. Dann wurden sie fixiert. Dies wurde mit neuen Sammlungen so oft wiederholt, bis von jedem Stamm ausreichend viele Embryonen gesammelt waren um mehrere Färbungen durchführen zu können. Teilweise erforderte dies bis zu etwa 10 Kurzzeit-Sammlungen pro Stamm (insgesamt mehrere Tausend Embryonen pro Stamm). Nachfolgend wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Twist und Even-skipped durchgeführt. Die gefärbten Embryonen wurden entwässert, in Kunstharz eingebettet und dann mit Hilfe von Mikroskopen phänotypisch begutachtet. Die Kunstharzeinbettung bietet zwei Vorteile:

Erstens können die gefärbten Embryonen in dem viskosen Einbettungsmedium leichter in die gewünschte Position gebracht werden, die für die Begutachtung nötig ist. Man kann sie zur vergleichenden Betrachtung aufreihen und nach Alter sortieren, ohne daß sie ihre Position verändern, was die Analyse erleichtert. Und man kann sie jederzeit einfrieren und bei Bedarf wieder auftauen und weiter untersuchen.

Zweitens hat man die Möglichkeit das Kunstharz auspolimerisieren zu lassen. Dann können die Embryonen nachfolgend mit einem Mikrotom geschnitten und eventuelle Phänotypen anhand von Querschnitten weiter analysiert werden. Auf die beschriebene Weise (Details siehe Kapitel 5, Material und Methoden) wurden alle der rund 200 Stämme untersucht.



**Abb. 2.3:** Die Karte der verwendeten autosomalen Deletionen. In rot sind die Regionen gekennzeichnet, die für eine normale Ventralfurchenbildung notwendig sind.

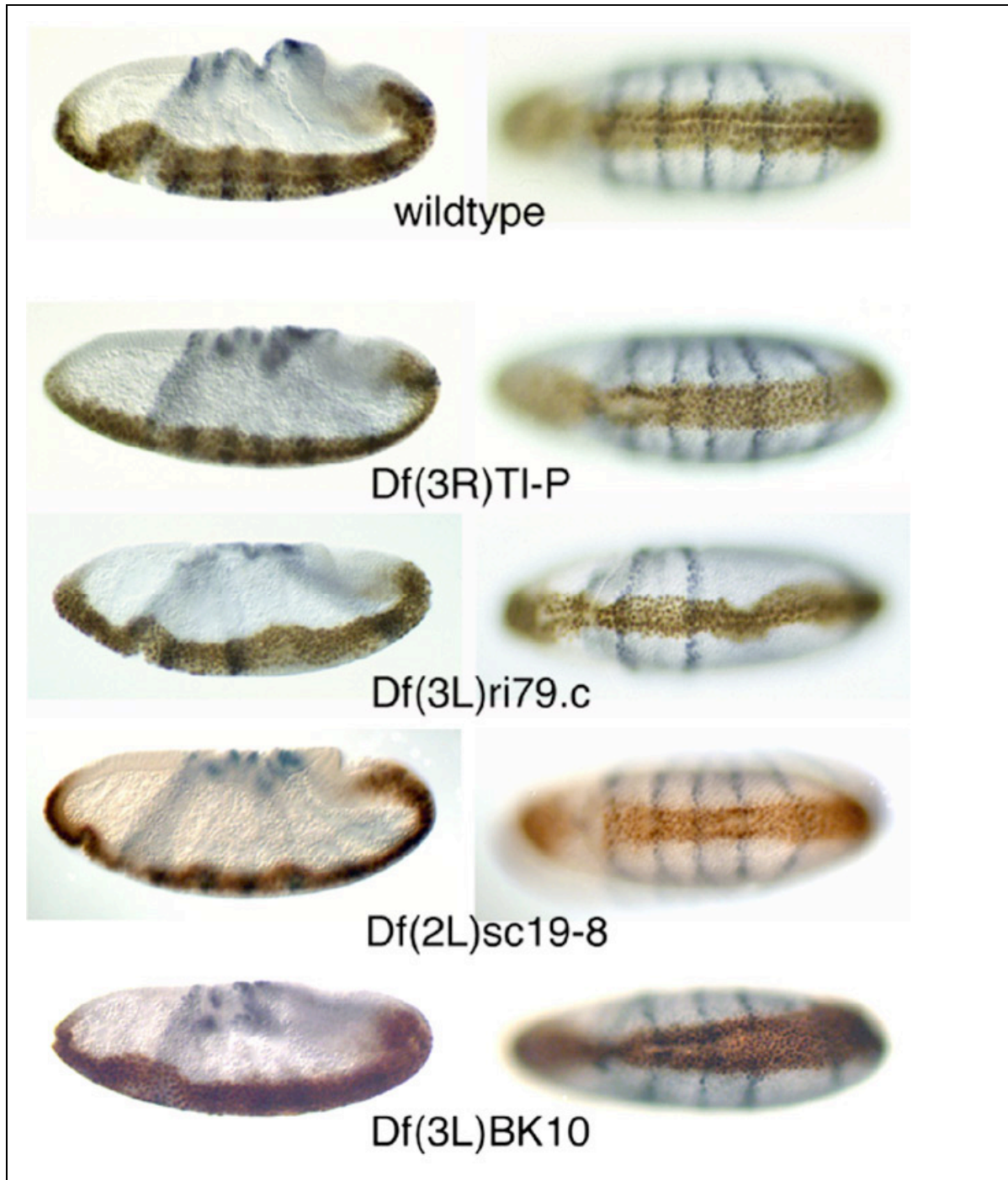
Nach Durchsicht und intensiver phänotypischer Analyse der Embryosammlungen aller ausgewählten Stämme konnten 4 Regionen identifiziert werden, deren Abwesenheit zu Defekten bei der Ventralfurchenbildung führt (s. Abb.2.3). Eine Region (repräsentiert durch *Df(2L)ed dp* und *Df(2L)sc19-8*) befindet sich auf Chromosomenarm 2L, zwei Regionen (*Df(3L)BK10* einerseits und *Df(3L)ri79c*, bzw. *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* andererseits) auf



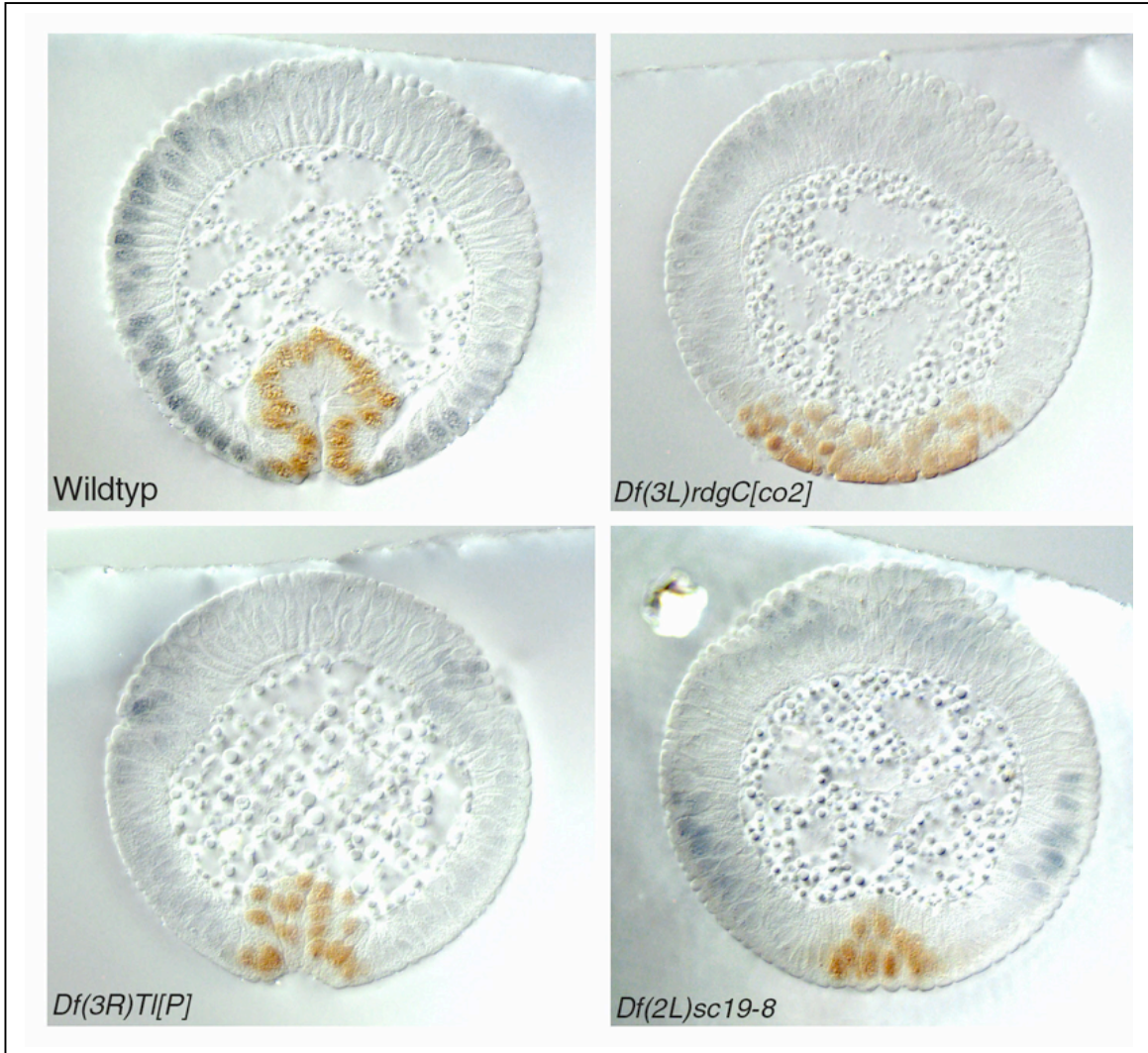
Arm 3L und die vierte Region (*Df(3R)Tl<sup>p</sup>*) auf Arm 3R. Keine der auf Arm 2R kartierenden Deletionen wies einen Defekt in der Ventralfurchenbildung auf. Eine Deletion, die *twist* aufdecken würde, wurde nicht verwendet, da angenommen werden kann, daß der Phänotyp von *twist* andere mutante Phänotypen, die Defekte bei der Ventralfurchenbildung aufweisen, überdecken würde.

Vergleichbar dem Phänotyp von *folded gastrulation* zeigt sich, daß das Mesoderm in allen vier Fällen mit einer gewissen Verzögerung in das Innere des Embryos gelangt (Abb. 2.4, whole mounts und Abb. 2.5, Querschnitte).

Ein Ausbleiben der Invagination, wie man es bei den Phänotypen von *snail* oder *twist* beobachtet, wurde bei keinem der verwendeten Stämme gefunden.



**Abb. 2.4** (vohergehende Seite): Die im Screen identifizierten Mutanten, deren Ventralfurchenbildung in homozygot defizienten Embryonen gestört ist. Links ist jeweils ein optischer Längsschnitt zu sehen, rechts daneben jeweils derselbe Embryo von ventral. Alle Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twist (braun) und Even-skipped (blau) gefärbt.



**Abb. 2.5:** Querschnitte der identifizierten Mutanten. Alle Embryonen sind gleich alt und wurden mit Antikörpern gegen Twist (braun) und Even-skipped (blau) gefärbt. In Wildtypembryonen ist die Invagination des Mesoderms zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen. Die Deletion *Df(3L)rdgCco2* repräsentiert dabei die mutanten Phänotypen von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)BK10*. Die Phänotypen dieser drei Deletionen sind nahezu identisch (s. a. Kap. 2.4)

### 2.1.2. Untersuchung von Doppeldefizienzen aus den identifizierten Regionen

Die gefundenen mutanten Phänotypen weisen alle schwache und vorübergehende Defekte bei der Invagination der Mesodermanlage auf. Andere frühe morphogenetische Prozesse sind von den Deletionen nicht betroffen (Ausnahme: Die Deletion von *even skipped*. Homozygot defiziente Embryonen bilden keine Kopffalte). Somit erweisen sich die gefundenen Phänotypen zumindest für die untersuchte Entwicklungspase als mesodermspezifisch. Daß es sich dabei um schwache und vorübergehende Phänotypen handelt, legte nahe zu vermuten, daß bei jedem der mutanten Phänotypen nur ein Teilprozess der Gastrulation defekt ist, das angenommene Netzwerk von regulatorischen und Effektorgenen insgesamt aber noch in der Lage ist, den Ausfall einer einzelnen Komponente zu kompensieren und die Invagination des Mesodermprimordiums zu vollenden. Es besteht die Möglichkeit, daß die im Defizienzenscreen aufgedeckten Gene an *verschiedenen* für die Ventralfurchenbildung notwendigen Prozessen beteiligt sind. Auch ohne die von den Deletionen aufgedeckten Gene zu kennen, ergibt sich daraus folgendes Gedankenexperiment:

Würde man zwei der angenommenen Teilprozesse *gleichzeitig* stören, so könnte dies dazu führen, daß es zu einer größeren Schwächung des gesamten, die Gastrulation steuernden Kontrollmechanismus kommt. Man könnte dann erwarten, daß es zu einer Verstärkung im Vergleich zu den Einzel-Phänotypen kommt. Im Extremfall wäre sogar denkbar, daß die Ventralfurchenbildung gänzlich blockiert würde, vergleichbar der Situation in Mutanten von *twist* oder *snail*. Dies wäre insbesondere dann zu erwarten, wenn man den einfachen Fall postulieren würde, daß die Kontrolle der Ventralfurchenbildung auf zwei gleichwertigen, parallelen Mechanismen beruht, von denen jeder für sich noch in der Lage wäre die Invagination zu steuern.

Um zu testen, ob eine der Annahmen zutrifft, wurden Embryonen erzeugt, in denen jeweils zwei der identifizierten Regionen gleichzeitig deletiert waren, was sechs möglichen Kombinationen entspricht. Dazu wurden aus den auf das dritte Chromosom kartierenden Deletionen durch Rekombination Chromosomen mit Doppel-Deletionen erzeugt, die stabil heterozygot in Fliegen gehalten werden konnten. Die drei Fälle, in

denen jeweils eine der auf das dritte Chromosom kartierenden Deletionen mit der Deletion des zweiten kombiniert werden mußte, wurden durch Kreuzung transient erzeugt.

Es wurden wiederum Embryonen aus Kurzzeitaufzucht gesammelt, und nachfolgend für die weitere Analyse mit Antikörpern gegen Twist und Even-Skipped markiert.

Die durch *Kreuzung* transient erzeugten doppelt-defizienten Embryonen wurden folgendermaßen analysiert (siehe Kreuzungsschema): Statistisch erwartet man je ein Viertel homozygot mutante Embryonen für die beiden einzelnen Defizienzen. Diese sind anhand des vorher beschriebenen Phänotyps zu identifizieren. Von den homozygoten Embryonen einer Defizienz wiederum würde statistisch die Hälfte zusätzlich heterozygot und ein Viertel homozygot für die andere Defizienz sein. Die Analyse basiert somit auf der Identifizierung von Embryonen, die je homozygot für eine der beiden Defizienzen sind und auf der Untersuchung, ob weitere Embryonen gefunden werden, die einen noch stärkeren Phänotyp aufweisen. Da es theoretisch möglich ist, daß bereits in der Situation, in der eine der beiden Defizienzen homozygot, die andere aber heterozygot vorliegt, zu einer Verstärkung gegenüber dem Einzelphänotypen kommt, ist statistisch zu erwarten, daß minimal ein Sechzehntel und maximal fünf Sechzehntel der Embryonen einer Sammlung einen stärkeren Ventralfurphenänotyp aufweisen-falls es zu einer Verstärkung kommt. Alle Embryonen wurden nach Gastrulationsphänotypen sortiert. Sie wurden dann untereinander und mit denen der einfach defizienten Embryonen verglichen. In dem Fall, wo *Df(3L)ri79c* beteiligt ist, konnten die für diese Defizienz homozygot mutanten Embryonen zusätzlich durch eine veränderte Even-Skipped-Expression identifiziert werden. Hier fehlt die Aktivität von *knirps*, was zu einem im Vergleich zum Wildtyp abweichenden Muster in der Expression von Even-Skipped führt (s. a. Kapitel 2.4).

Die durch *Rekombination* hergestellten Doppeldefizienzen wurden wie folgt analysiert: Statistisch erwartet man, wie bei anderen heterozygot gehaltenen Mutationen auch, daß ein Viertel der Embryonen den mutanten Phänotyp zeigt. Zur Identifizierung der Embryonen, die doppelt defizient waren, wurde nach solchen Embryonen gesucht, die Abweichungen im Ablauf der Ventralfurcbildung gegenüber dem Wildtyp zeigten. Dies konnte aufgrund der Einzelphänotypen angenommen werden. Diese

wurden herausortiert und deren Phänotypen mit denen der einfach defizienten Embryonen verglichen. In den beiden Fällen, in denen *Df(3L)ri79c* beteiligt war, konnten die homozygot mutanten Embryonen wiederum durch die Even-Skipped Färbung identifiziert werden. Lediglich im Fall der Kombination der Defizienzen *Df(3L)BK10* und *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* wurde nur nach Phänotyp sortiert.

Eine Übersicht der analysierten genetischen Situationen ist in untenstehender Tabelle dargestellt. In keiner der untersuchten Situationen konnte eine Verstärkung gegenüber den vorher beobachteten Einzelphänotypen festgestellt werden.

| <b>N a m e n     d e r<br/>benutzten<br/>Defizienzen</b> | <b>kombiniert durch</b> | <b>Ergebnis</b>                                 |
|--|-------------------------|---|
| <i>Df(2L)ed dp</i><br><i>Df(3L)BK10</i>                  | Kreuzung, transient     | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |
| <i>Df(2L)ed dp</i><br><i>Df(3L)ri79c</i>                 | Kreuzung, transient     | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |
| <i>Df(2L)ed dp</i><br><i>Df(3R)Tl<sup>P</sup></i>        | Kreuzung, transient     | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |
| <i>Df(3L)BK10</i><br><i>Df(3L)ri79c</i>                  | Rekombination           | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |
| <i>Df(3L)BK10</i><br><i>Df(3R)Tl<sup>P</sup></i>         | Rekombination           | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |
| <i>Df(3L)ri79c</i><br><i>Df(3R)Tl<sup>P</sup></i>        | Rekombination           | keine Verstärkung des<br>Gastrulationsphänotyps |

### 2.1.3. Untersuchung ventral exprimierter Gene auf genetische Interaktion mit *folded gastrulation* hin

Durch die Erzeugung von Doppeldefizienzen sollte getestet werden, ob durch gleichzeitige Deletion von zwei notwendigen Regionen des Genoms möglicherweise redundante Mechanismen gleichzeitig gestört und dadurch eine Verstärkung der mutanten Phänotypen der einzelnen Defizienzen erreicht werden. Dies war nicht der Fall. Der gleiche gedankliche Ansatz wurde in modifizierter Form wiederholt. Embryonen, die homozygot für *folded gastrulation* und zusätzlich heterozygot für die *snail twist*-Doppelmutante sind, zeigen einen wesentlich stärkeren Defekt bei der Ventralfurchenbildung als Embryonen, die nur homozygot für *folded gastrulation* sind (T. Seher, Diplomarbeit, Köln, 1996). Auf der Grundlage dieses Ergebnisses wurde untersucht, ob die im Defizienzen-Screen identifizierten Deletionen ebenfalls eine genetische Interaktion mit *folded gastrulation* zeigen.

Dazu wurden durch Kreuzungen die Doppelmutanten vorübergehend und nicht in Form stabiler Stämme erzeugt.

Die Kreuzung folgte dem Schema:

$$Y/+; Df/+ \times fog/+; Df/+.$$

Parallel dazu wurde ein zweiter Ansatz verfolgt. Es gibt Gene, von denen bekannt ist, daß sie vor der Gastrulation ähnlich wie *snail* und *twist* in der Mesodermanlage exprimiert sind. Für sie war bisher entweder überhaupt keine Funktion oder keine Funktion während der Morphogenese des Mesoderms bekannt. Daher sollten auch diese daraufhin getestet werden, ob sie möglicherweise Teil eines redundanten Mechanismus bei der Ventralfurchenbildung sind. Bei diesen Genen handelte es sich um *schnurri*, *t48* und *PPi-16*.

*schnurri* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der dpp-Signaltransduktion während der Mitteldarmmorphogenese spielt (Grieder et al., 1995).



*t48* ist ein Gen, daß als Zielgen von Ultrabithorax identifiziert wurde und sehr dynamisch während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert ist (Strutt and White, 1994). Homozygot mutante Embryonen zeigen keinerlei Defekte und entwickeln sich zu lebensfähigen und fertilen Fliegen (Strutt and White, 1994). Die Expression von *t48* in der Mesodermanlage hängt von *twist* ab (Leptin, 1991).



**Abb. 2.6:** Das RNA-Expressionsmuster von *t48* während der Zellularisierung. *T48* ist in dieser Phase der Entwicklung im Bereich der Mesodermanlage exprimiert. Photographie von Maria Leptin.

*PPi-16* wurde molekular identifiziert. Punktmutationen existieren bisher nicht (daher wurde eine Defizienz verwendet) und seine Funktion ist unbekannt (Hawcroft and Alphey, 1995). Die Expression von *PPi-16* ähnelt derjenigen von *folded gastrulation* und machte es daher zu einem interessanten Kandidaten für eine weitere Untersuchung.

Es wurden transient doppelt-mutante Embryonen erzeugt. Die Kreuzung folgte dem gleichen Schema wie die oben gezeigte für die Defizienzen. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden mit Antikörpern gegen Twist und Even-skipped gefärbt. Die gefärbten Embryonen wurden qualitativ und statistisch ausgewertet. Qualitativ heißt dabei, daß alle Embryonen zunächst einer Begutachtung der Mesodermmorphogenese unterzogen und auf Auffälligkeiten untersucht wurden.

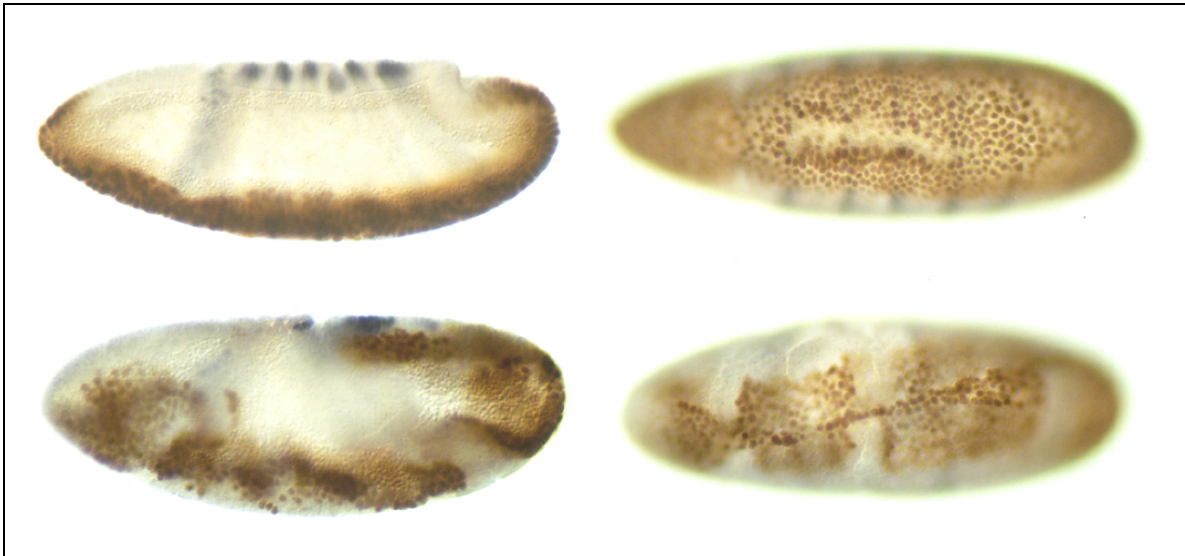
In einem Fall kann eine genetische Interaktion festgestellt werden. Als einzige der vier Defizienzen zeigte *Df(3R)Tl<sup>p</sup>* eine Verstärkung des Ventralfurchendefektes in der Interaktion mit *folded gastrulation*. In vielen der untersuchten Embryonen invaginiert



das Mesoderm unvollständig. Da wo das Mesoderm invaginierte, wurden starke Faltungen beobachtet. Die Invagination der posterioren Mitteldarmmorphogenese in diesen Mutanten zeigte, daß es sich dabei nicht um hemizygote *folded gastrulation*-Mutanten handeln konnte. Bei vielen der Embryonen mit stark gestörter Venturfurchenbildung wurde keine Mitteldarminvagination festgestellt. Bei diesen handelte es sich um hemizygote *folded gastrulation*-Mutanten. Embryonen mit solchem Phänotyp fanden sich auch in den Kreuzungen mit den anderen Defizienzen und waren von normalen *folded gastrulation*-Mutanten kaum zu unterscheiden. Das machte deutlich, daß solche Embryonen schwer zu analysieren sind, denn andere Prozesse der frühen Morphogenese werden durch den starken Mitteldarmphänotyp ebenfalls gestört. Bei der Interaktion von mit *folded gastrulation* jedoch war eindeutig, daß es sich nicht um hemizygote *folded gastrulation*-Mutanten handelte. Es wurden lebende Nachkommen aus der Interaktions-Kreuzung von *folded gastrulation* mit *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* untersucht. Embryonen, die durch starke Faltungen im Bereich des Mesoderms auffielen, wurden heraussortiert und beobachtet. Wenn unter diesen Embryonen solche waren, die keine Mitteldarminvagination zeigten, wurden sie entfernt. Die Entwicklung der restlichen Embryonen wurde weiter beobachtet. 81% dieser Embryonen zeigten frühzeitig schwere Entwicklungsdefekte und starben. Eine Kontrollgruppe von Embryonen, die von heterozygoten *Df(3R)Tl<sup>P</sup>*-Eltern stammten, zeigten bei etwa einem Viertel der Embryonen (diese waren vermutlich die Homozygoten, alle anderen Nachkommen waren zu nahezu 100% vital) eine Letalität von etwa 7%. Damit war gezeigt, daß hier eine Verstärkung des Gastrulationsphänotyps sowohl von *folded gastrulation* als auch von homozygoten Embryonen vorlag. Da keine anderen mutanten Chromsomen in die Kreuzung eingingen, konnte es sich nur um eine Interaktion zwischen der Deletion und der Mutation in *folded gastrulation* handeln. *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* ist eine relativ große Deletion. Sie entfernt etwa 1% des Genoms von *Drosophila*. Eine Abschätzung für mögliche Kandidatengene, die für eine Erklärung der Defekte in Frage kamen, wurde dadurch schwierig.

Bei der Auswertung der Interaktion der drei ventral exprimierten Gene, die der gleichen Kreuzung und der gleichen Analyse unterzogen wurden, kam es in einem Fall zu einer klaren Verstärkung. Dies war die Interaktion von *t48* mit *folded gastrulation* (s.

Abb. 2.7). Die Auswertung ergab auch hier, daß sich die Interaktion am klarsten bei Embryonen zeigte, deren Mitteldarminvagination bewies, daß es sich nicht um hemizygote *folded gastrulation*-Mutanten handelte. Es gab weitere Parallelen. Die in den Nachkommen beobachtbaren Defekte bei der Ventralfurchenbildung glichen fast völlig denen, die bei der Interaktion von *folded gastrulation* mit *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* beobachtet wurden. *t48* kartiert in die Region, die in *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* deletiert ist und ist dadurch ein wahrscheinlicher Kandidat um die Effekte, die in der Defizienz beobachtet wurden, zu erklären. Da die beiden Phänotypen kaum unterscheidbar sind, kann der Einfluß anderer Gene nahezu ausgeschlossen werden.

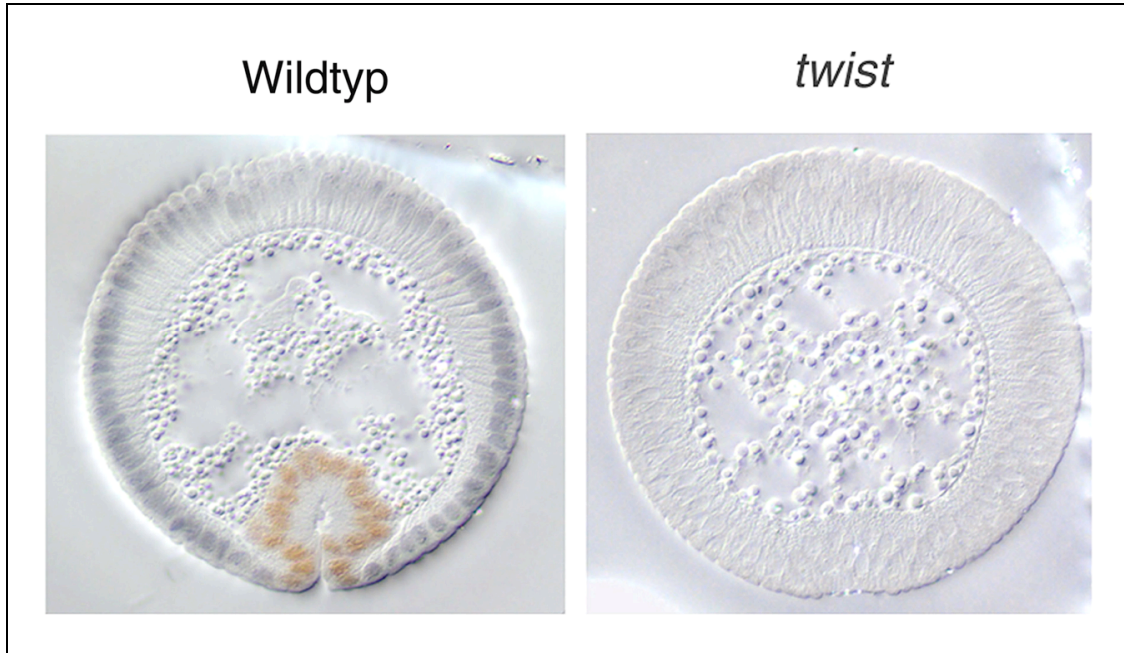


**Abb. 2.7:** Der mutante Phänotyp, der auftritt, wenn *folded gastrulation* mit *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* interagiert. Es kommt zu einer starken Störung der Invagination und der nachfolgenden morphogenetischen Prozesse des Mesoderms. Es handelt sich dabei nicht um Embryonen, die homozygot mutant für *fog* sind (siehe Mitteldarminvagination). Links optische Längsschnitte von zwei Embryonen, rechts daneben jeweils derselbe Embryo in einer Ansicht von ventral. Die Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twist (braun) und Even-skipped (blau) gefärbt.

Im beschriebenen Defizienzen-Screen wurden somit vier Regionen identifiziert, die notwendig für eine normale Ventralfurchenbildung sind. Für eine der Deletionen, *Df(3R)Tl<sup>P</sup>*, wurde ein Gen, *t48*, als sehr wahrscheinlicher Kandidat identifiziert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die von den Defizienzen *Df(3L)BK10* und

insbesondere von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* produzierten Phänotypen untersucht (Kap.2.4). Außerdem wurde auf der Grundlage der Ergebnisse des Screens eine weitere Analyse der Funktionen von *snail* (Kap.2.3) und *twist* (Kap.2.2) vorgenommen.

## 2.2. Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle des Gens *twist* während der Ventralfurchenbildung



**Abb. 2.8:** Querschnitte eines Wildtyp- und eines für *twist* mutanten Embryos. Beide wurden mit Antikörpern gegen Twist und Even-skipped gefärbt. Die *twist*-Mutante ist eine Nullmutante in der kein Twist-Protein gebildet wird.

### 2.2.1 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen des Defizienzen-Screens und daraus resultierende Überlegungen zur Rolle von *twist*:

#### Der Experimentelle Ansatz zur Untersuchung der Rolle von *twist*

Die während des Defizienzen-Screens aufgedeckten Loci zeigen, daß es weitere an der Kontrolle der Ventralfurchenbildung beteiligte Gene gibt. *tribbles* ist ein Beispiel (siehe Kap. 2.4), *t48* wahrscheinlich ein weiteres. Im günstigsten Fall würden die in den vier Regionen aufgedeckten Gene, abgesehen von *folded gastrulation* und *snail*, alle wichtigen Zielgene von *snail* und *twist* darstellen. Zwar konnte experimentell keine Situation erzeugt werden, in der alle vier identifizierten Regionen gleichzeitig aus dem

Genom entfernt wurden, aber die Annahme, daß möglicherweise alle wichtigen Zielgene von *snail* und *twist* identifiziert wurden, läßt sich auch ohne diese Daten diskutieren. Wären *folded gastrulation* und die vier aufgedeckten Loci die einzigen wichtigen Zielgene, die zu identifizieren waren um die Kontrolle der Gastrulation zu verstehen, dann reduziert sich die Anzahl bei der folgenden Überlegung bereits auf drei: *frühstart* und *tribbles* können nicht zu den eigentlichen Zielgenen gerechnet werden, weil sie nur eine permissive Rolle und keine instruktive Rolle spielen. Sie machen die Zellformänderungen möglich, weil sie Zellteilungen blockieren, aber sie instruieren die mesodermalen Zellen nicht ihre Form zu ändern. Es bleiben somit nur drei Gene oder Loci übrig, *folded gastrulation* und die beiden anderen Defizienzen. Eine davon hat vermutlich *t48* aufgedeckt. Dessen Rolle ist momentan schwer zu bewerten, denn einerseits ist *t48* völlig verzichtbar, andererseits zeigt es eine sehr starke Interaktion mit *folded gastrulation*. Wie spezifisch diese für die Mesoderminvagination ist, muß noch gezeigt werden. Der dritte Locus kann bisher kaum beurteilt werden, da er keinerlei Interaktionen zeigte, weder mit *folded gastrulation* noch mit einer der anderen Defizienzen, die homozygot Gastrulationsdefekte verursachen. Angesichts der Vielzahl an Prozessen, die man für die Abänderung der Zellform unterstellen darf, scheint es sehr unwahrscheinlich, daß diese drei Loci und das, was sich in ihnen verbirgt, ausreichen sollten, um die mutanten Phänotypen von *snail* oder *twist* erklären zu können. Es muß meiner Ansicht nach davon ausgegangen werden, daß es weitere bisher unentdeckte Faktoren gibt, die eine wichtige Rolle bei der Ventralfurchenbildung spielen. Entweder hat der Screen nicht alle Loci aufgedeckt, die für die Fragestellung von Bedeutung sind. Dann bedarf es der Identifizierung weiterer Zielgene von *snail* und *twist* um zu verstehen welche Prozesse von ihnen kontrolliert werden.

Oder man macht die gänzlich entgegengesetzte Annahme und spekuliert, ob es vielleicht weniger Zielgene von *snail* und *twist* gibt, als bisher angenommen (siehe Diskussion, Kap.3). Diese Annahme hinterfragt die Rolle von *twist* für die Ventralfurchenbildung, und läßt sich mit der folgenden Überlegung begründen: Wie in der Einleitung bereits dargelegt, hat *twist* für die Mesodermentwicklung in *Drosophila* vor allem die Funktion, andere Gene zu aktivieren, was sowohl für die Steuerung der Invagination des Mesoderms als auch für die Kontrolle der Differenzierung des

Mesoderms gezeigt wurde (Bodmer, 1993; Casal and Leptin, 1996; Costa et al., 1994; Ip et al., 1992; Morize et al., 1998; Riechmann et al., 1997; Vincent et al., 1998; Yin et al., 1997). Der Defizienzen-Screen basiert, ebenso wie andere genetische Screens auf der Auswertung von Verlustmutationen. Es wurde daher erwartet, vor allem neue, im Mesoderm aktivierte, d.h. wahrscheinlich Zielgene von *twist* zu finden. Darüber hinaus wurde angenommen, daß es mehrere solcher Zielgene geben muß, die für die frühe Morphogenese des Mesoderms notwendig sind. Wie bereits gesagt sind - abgesehen von *twist* selbst - *snail* und *folded gastrulation* die einzigen Zielgene von *twist*, von denen bekannt ist, daß sie für die normale Invagination des Mesoderms notwendig sind. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen bezüglich der im Defizienzenscreen aufgedeckten Loci läßt sich zusätzlich nur *t48* als Zielgen von *twist* ableiten, das möglicherweise eine Rolle bei der Ventralfurchenbildung hat. Wie gezeigt, ist die Aktivität von *t48* aber komplett verzichtbar für die Ventralfurchenbildung (Leptin, 1991; Strutt and White, 1994). Da somit neue Zielgene von *twist*, die notwendig für die Ventralfurchenbildung sind, bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten, stellte sich die grundsätzliche Frage, ob es weitere solche Zielgene von *twist* überhaupt gibt. Wenn solche nicht existierten, dann ergäbe sich im Umkehrschluß die Hypothese:

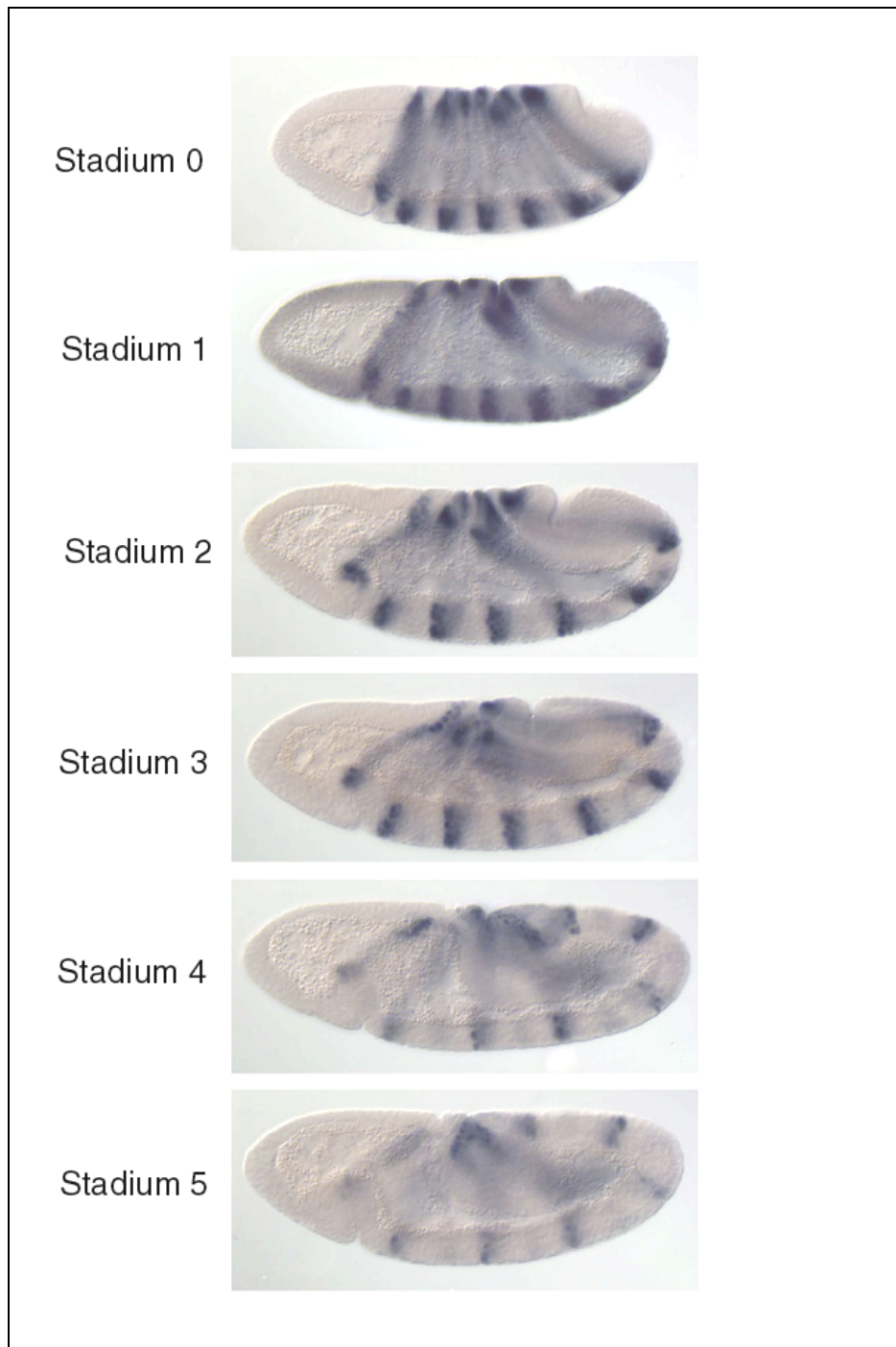
*snail* und *folded gastrulation* sind die einzigen Zielgene von *twist*, die für einen normalen Ablauf der Ventralfurchenbildung notwendig sind.

Zur Überprüfung der Hypothese müßte man eine Situation herstellen, in der die Aktivität von *twist* fehlte, *snail* und *folded gastrulation* aber unabhängig von *twist* im Bereich der Mesodermanlage aktiviert würden. Auf diese Weise müßte sich die Invagination des Mesoderms wiederherstellen lassen. Eine solche Situation sollte genetisch in Embryonen erzeugt werden.

### **2.2.2 Beschreibung der morphogenetischen Restaktivität in *twist*-Mutanten**

Da die Ventralfurchenbildung im Vergleich zu *twist* Mutanten untersucht werden sollte, erschien es wichtig - vergleichbar der Untersuchung der Gastrulation in

Wildtypembryonen vor dem Defizienzenscreen - zunächst eine Analyse der *twist*-Mutanten durchzuführen, deren Ergebnisse anschließend als Referenz bei der Analyse der Rettungsexperimente dienen sollten. In Embryonen, die mutant für *twist* sind, findet zwar keine Invagination des ventralen Gewebes statt, aber es wurde beobachtet, daß im Mesoderm von *twist*-Embryonen Reste von morphogenetischer Aktivität auf der ventralen Seite zu beobachten sind (Leptin, 1991; Leptin and Grunewald, 1990). Es erschien daher wichtig, zunächst den Phänotyp von *twist*-Mutanten genau zu untersuchen, um etwaige Variabilitäten genau zu erfassen. Diese Restaktivität mußte für die nachfolgenden Experimente präziser beschrieben werden. Nur so konnten durch die Expression von *twist*-Zielgenen erzielte Effekte auf die Morphogenese der Mesodermanlage bewertet und interpretiert werden. Dazu wurden Embryonen eines Null-Allels von *twist* gesammelt: *twi*<sup>EY53</sup>. In Embryonen, die homozygot für dieses Allel sind, wird kein Twist-Protein gebildet. Durch Färbung mit Twist-Antikörpern können homozygot mutante Embryonen deshalb eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich wurden die Embryonen mit Hilfe von Antikörpern gegen Even-skipped gefärbt. Nachdem homozygot mutante Embryonen herausortiert worden waren, wurden mit Hilfe der Markierung gegen Even-skipped 6 aufeinanderfolgende Gastrulations-Stadien definiert. Diese wurden mit ‚Gastrulationsstadium 0‘ bis ‚Gastrulationsstadium 5‘ bezeichnet (s. Abb. 2.9). Jedes dieser Stadien ist durch die Kombination aus sichtbaren morphogenetischen Prozessen und der Position der einzelnen Even-skipped-Streifen genau definiert (s. Abb. 2.10). Solche Kriterien zu finden war wichtig, weil Embryonen gleichen Entwicklungsstadiums miteinander verglichen werden sollten. Angesichts der Schnelligkeit der frühen morphogenetischen Prozesse sollte die Variabilität innerhalb einer Gruppe gleich weit entwickelter Embryonen möglichst gering gehalten werden. Mit der gewählten Methode konnte diese Anforderung erfüllt werden. Es wurden ausreichend viele Embryonen gesammelt und gefärbt, sodaß jedem Stadium eine Gruppe von Embryonen zugeordnet werden konnte. Von jedem Stadium wurden dann Embryonen (mindestens 5) in Araldit eingebettet und von allen transversale Schnitte angefertigt.



**Abb. 2.9:** Definition von sechs Gastrulationsstadien. Mit Hilfe von Antikörpermarkierungen (blau: Even-skipped) und morphologischen Kriterien wurden sechs aufeinanderfolgende Stadien für vergleichende Untersuchungen definiert ( s.a. Abb. 2.10).



Parallel wurde mit Wildtyp-Embryonen genauso verfahren, sodaß von beiden Genotypen pro Gastrulations-Stadium komplette Serien geschnittener Embryonen vorlagen. Danach wurden die Schnitte am Mikroskop begutachtet und die Schnitte aller Embryonen möglichst vollständig von anterior nach posterior durchphotographiert. Anschließend wurden sie ausgewertet. Es wurde dabei die Invagination bzw. der morphologische Zustand in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium erfaßt.

Folgende Aspekte standen hierbei im Vordergrund:

- die Variabilität der Ventralfurchenbildung in Wildtypen
- die Variabilität der Aktivität in den ventralen Zellen in *twist*-Mutanten
- Vergleich der Variabilität zwischen den verschiedenen Gastrulations-Stadien in *twist*-Mutanten

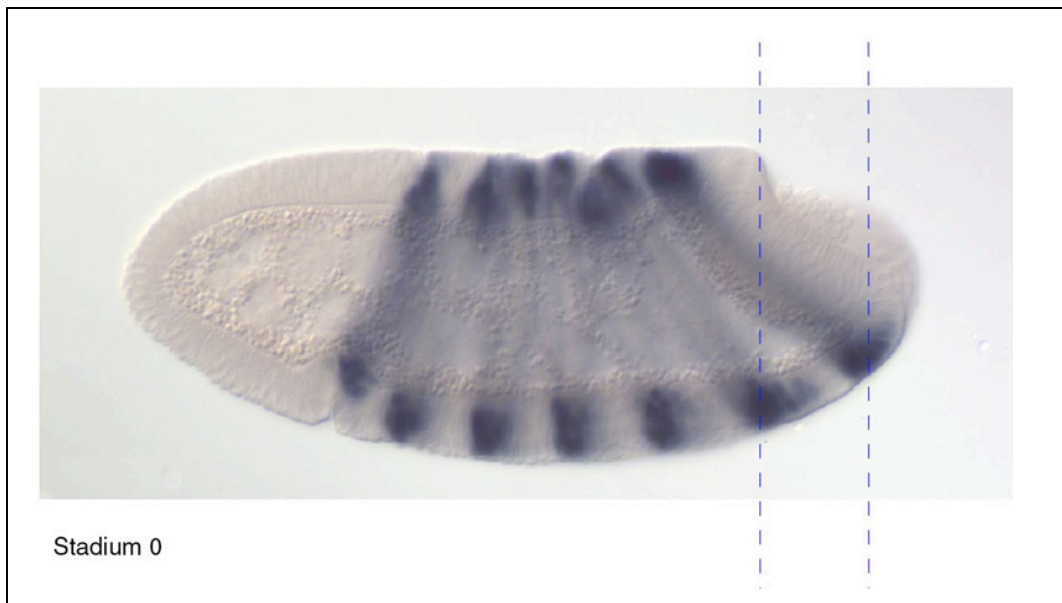


Abb. 2.10: Beispiel für die Definition eines Gastrulationsstadiums. Die Position der beiden hinteren Even-skipped-Streifen in Relation zur hinteren Mitteldarminvagination definiert dieses Stadium präzise.

Für die Auswertung wurde in jedem Embryo ein Bereich definiert, der die mittleren 50% eines Embryos entlang der anterior-posterioren Achse umfaßt (im folgenden als Kernbereich bezeichnet).

Als Anhaltspunkt für die anteriore Grenze diente die Kopffalte, die auf den Schnitten deutlich zu sehen ist. Die am meisten anterior gelegenen Schnitte, die in die

Auswertung einfließen, waren solche, in denen das posteriore Ende der Kopffalte zu sehen ist. Das posteriore Ende des zentralen Bereichs war schwieriger zu definieren. Ich legte mich darauf fest, nur solche Schnitte auszuwerten, deren Durchmesser mindestens 75% des maximalen Durchmessers des betreffenden Embryos erreichten.

Wildtyp-Embryonen zeigen bei der Auswertung bezüglich der Invagination ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. Dies gilt für alle 6 betrachteten Stadien und alle ausgewerteten Embryonen. Die Reproduzierbarkeit zeigt sich sowohl beim Vergleich von Schnitten aus verschiedenen Embryonen gleichen Stadiums, als auch beim Vergleich von verschiedenen Schnitten, die aus dem zentralen Bereich desselben Embryos stammen. Innerhalb eines Stadiums lassen sich kaum Abweichungen feststellen. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde für jedes Stadium ein entsprechender Schnitt eines Wildtypembryos als Referenz ausgewählt (s. Abb 2.11).

Da bereits bekannt war, daß in *twist*-Mutanten noch eine morphogenetische Aktivität der Mesodermanlage nachweisbar ist, wurde bei der Auswertung wie folgt verfahren:

Zunächst wurden alle Schnitte aller Stadien durchgesehen. Dann wurden von allen Schnitten eines Stadiums jeweils zwei Schnitte ausgewählt. Der eine repräsentiert dabei den Bereich maximaler Morphogenese, der in diesem Stadium gefunden werden kann. Der andere repräsentiert den Bereich minimaler Morphogenese. Dabei wurde keine Gewichtung der Häufigkeit vorgenommen. Wichtiger erschien es mir durch die Gegenüberstellung minimaler und maximaler morphogenetischer Aktivität die Bandbreite derselben innerhalb jedes Stadiums zu verdeutlichen (Abb. 2.11).

Aus der Gegenüberstellung lassen sich mehrere Ergebnisse ablesen:

- 1) Es gibt Bereiche in *twist*-Mutanten, in denen zu einem Zeitpunkt, zu dem im Wildtyp die Ventralfurche bereits invaginiert ist, nahezu keine Zellformveränderungen gefunden werden können. Dies kann in fast allen der definierten Gastrulationsstadien beobachtet werden. Eine Ausnahme stellt Stadium 3 dar. Dort sind immer Vertiefungen in der Mesodermanlage zu beobachten.
- 2) Es gibt Bereiche innerhalb von *twist*-Mutanten, in denen eine deutliche Invagination festgestellt werden kann. Das gilt ebenso für fast alle Stadien. In Stadium 0 fällt das

Maximum gering aus. In den Stadien 1 bis 3 können dagegen deutliche Invaginationen beobachtet werden. Am stärksten fällt dies in den Stadien 2 und 3 aus.

3) Die Bandbreite an morphologischer Aktivität ist verschieden groß in den verschiedenen Stadien. Dabei ist sie in Gastrulationsstadium 0 sehr gering, nimmt dann zu und in den beiden letzten Stadien wieder ab. Am größten ist die Bandbreite in den Stadien 1 bis 3, das Maximum sehe ich in Stadium 2. Die gegenübergestellten Minima und Maxima stammen teilweise aus demselben Embryo. Das zeigt, daß die Bandbreite von Embryo zu Embryo schwanken kann.

4) Es wurden keine Schnitte gefunden, in denen die Invagination der ventralen Zellen von *twist*-Mutanten der von Wildtyp-Embryonen gleicht. Die mangelnde Tiefe der Invagination selbst in den Bereichen maximaler Aktivität und die mangelnde Koordination der invaginierenden Zellen in allen Schnitten der *twist*-Mutanten markieren hierbei die deutlichsten Unterschiede. Hinzu kommt, daß sich auch in den der Wildtyp-Situation am nächsten kommenden Schnitten (siehe Maxima der Stadien 1 bis 3 in Abb. 2.11) die Zellformänderungen, die beobachtet werden können, deutlich von denen in Wildtyp-Embryonen unterscheiden. Charakteristisch sind die abgerundeten Apizes und die Membranausstülpungen der invaginierenden Zellen.

Die Analyse zeigt also, daß ein Spektrum an morphogenetischer Aktivität in *twist*-Mutanten aller hier betrachteten Stadien nachweisbar ist. Sie ist jedoch meist gering und nur in Einzelfällen ist in Ansätzen eine als Furche benennbare Struktur zu erkennen. Die in den *twist*-Mutanten gefundene morphogenetische Aktivität ist also keine kontinuierliche und die gesamte Mesodermanlage gleichmäßig erfassende Aktivität, sondern ist Schwankungen unterworfen, die sich innerhalb eines Embryos, beim Vergleich verschiedener Embryonen gleichen Stadiums und beim Vergleich verschiedener Stadien feststellen lassen.

Die hier beschriebene Restaktivität in *twist*-Mutanten stellt gewissermassen das Hintergrundrauschen dar, welches bei der Auswertung der folgenden Experimente berücksichtigt werden mußte.

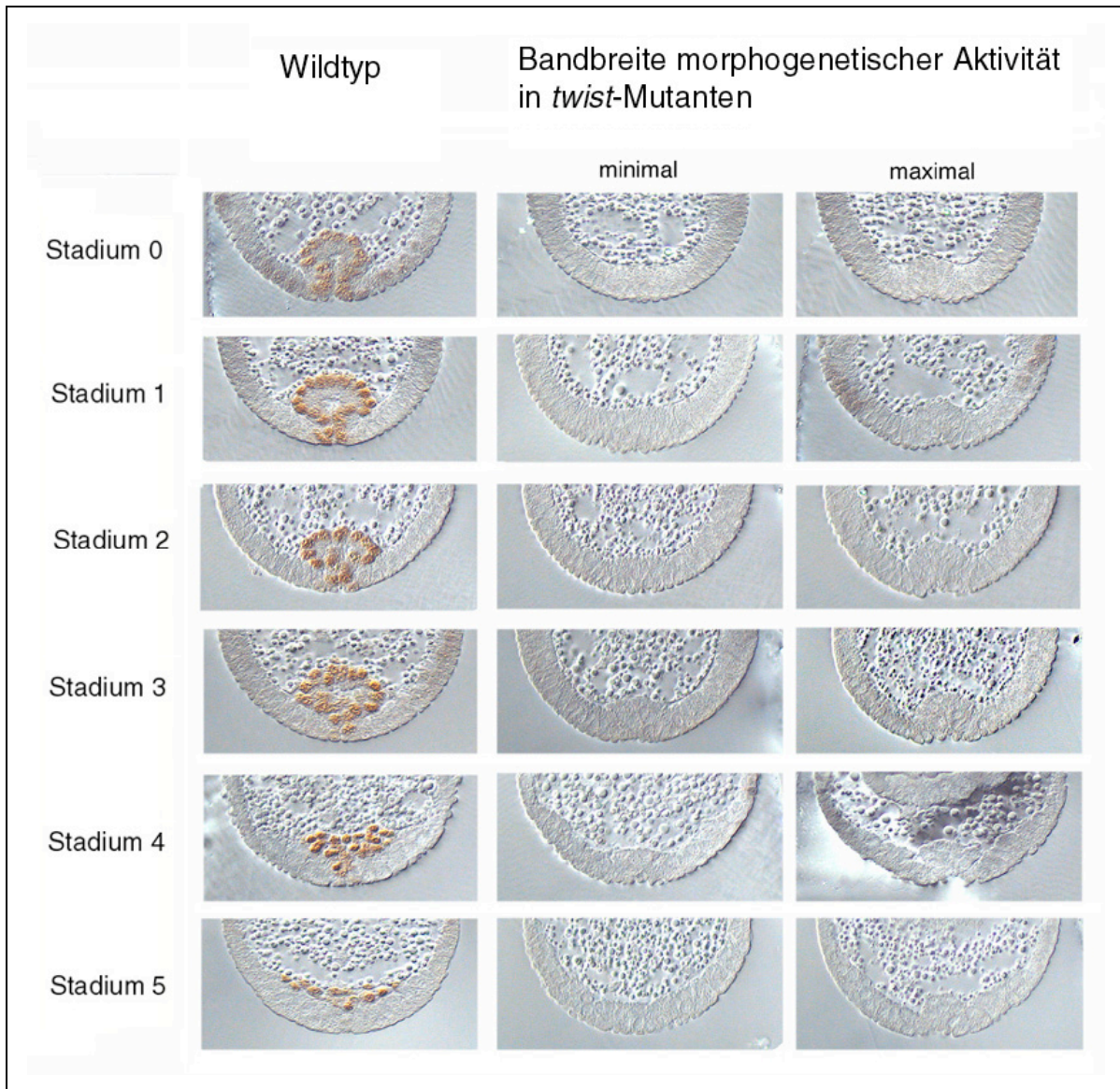
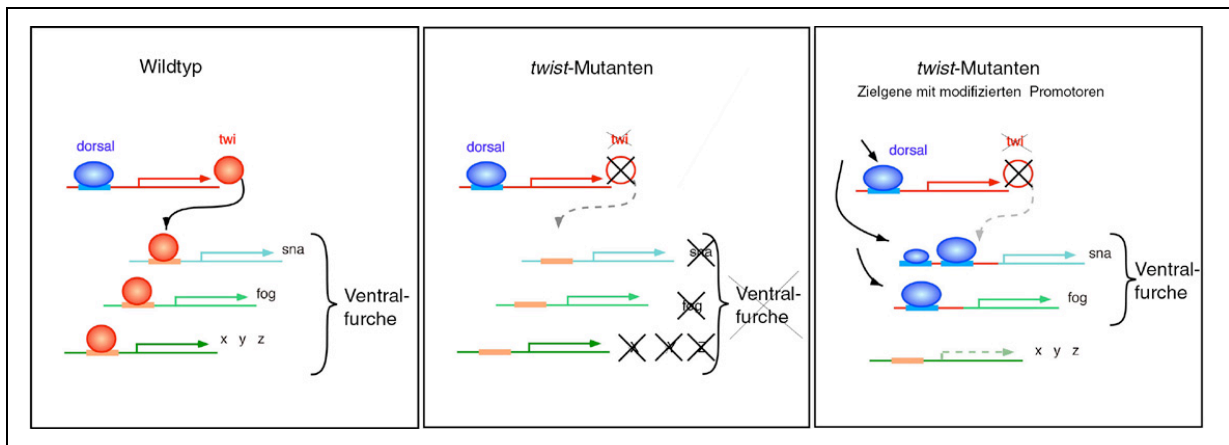


Abb. 2.11: Untersuchung der Mesodermanlage in *twist*-Mutanten auf Reste von morphogenetischer Aktivität. Minimale und maximale morphogenetische Bewegungen wurden für jedes der in Abb. 2.9 definierten Stadien untersucht. Alle Embryonen wurden mit Antikörpern gegen Twist (braun) und Even-skipped (blau) gefärbt.

### 2.2.3 Ventralfurchenbildung ohne *twist*-Aktivität? Der Versuch *twist* durch seine Zielgene zu ersetzen

Um Zielgene von Twist im Bereich der Mesodermanlage zu exprimieren, selbst wenn keine Aktivität von *twist* vorhanden ist, wurden Konstrukte hergestellt, in denen die betreffenden Gene mit einem Teil des *twist*-Promotors, dem sogenannten *proximal element* (PE) fusioniert sind. Unter der Kontrolle des *proximal element* werden die betreffenden Gene nun von Dorsal spezifisch auf der ventralen Seite des Embryos aktiviert, und können auf diese Weise unabhängig von *twist* exprimiert werden. (Jiang et al., 1991; Jiang and Levine, 1993). Das Prinzip der Wirkungsweise ist in Abb. 2.12 dargestellt. Solch ein Konstrukte existierte für *snail* (Quelle: M. Levine, (Jiang et al., 1991; Jiang and Levine, 1993; Jiang et al., 1992)) und wurde für *folded gastrulation* hergestellt (siehe Material und Methoden).



**Abb. 2.12:** Das Prinzip der Rettungsexperimente in *twist*-Mutanten. Die bekannten Zielgene von *twist* werden mit einem Promotor-Element des *twist*-Promotors ausgestattet, durch das sie von dem Protein Dorsal aktiviert werden können.

Mit Hilfe dieser Konstrukte wurden Fliegen transformiert und stabile Stämme etabliert. Anschließend wurden die transgenen Chromosomen in *twist*-Mutanten eingekreuzt und folgende Stämme konstruiert:

- 1.) *twi*<sup>EY53</sup>, PE-*fog*/CyO
- 2.) *twi*<sup>EY53</sup>/CyO; 2xPE-*sna*
- 3.) *twi*<sup>EY53</sup>, PE-*fog*/CyO; 2xPE-*sna*

### 2.2.3.1 Morphologische Analyse der Rettungsexperimente in *twist*-Mutanten

Was geschieht, wenn man *fog*, *snail* oder beide zusammen in *twist*-Mutanten in dem Bereich des Embryos exprimiert, aus dem normalerweise das Mesoderm hervorgeht? In jedem dieser Stämme wurde die Ventralfurchenbildung untersucht. Zur Analyse wurden von den angegebenen Stämmen Embryonen gesammelt und homozygot mutante Embryonen ausgewertet. Diese konnten wie bei den *twist*-Mutanten durch Färbung mit Antikörpern gegen Twist eindeutig identifiziert werden. Wie zuvor bei den *twist*-Mutanten wurden mit Hilfe der Even-skipped-Färbung für jeden Genotyp die bereits beschriebene Serie von aufeinanderfolgenden Gastrulationsstadien präzise aus den gefärbten Embryosammlungen herausgesucht. Es wurden hierbei jedoch nur die Gastrulationsstadien 0 bis 3 untersucht, da in diesen die stärkste verbleibende Aktivität in *twist*-Mutanten gefunden wurde. Von den sortierten Embryonen wurden serielle transversale Schnitte angefertigt.

Die Ergebnisse der morphologischen Analyse sind in Abb. 2.12 zusammengefasst. Die Analyse hatte mehrere Ergebnisse:

1) Jedes der Transgene verbessert die Situation gegenüber *twist*-Mutanten. Dies zeigt der direkte Vergleich mit den abgebildeten Schnitten von *twist*-Mutanten.

#### 2) Der Effekt von PE-*fog*

Bei Embryonen, die homozygot für *twi*, PE-*fog* sind, kann man einen Effekt deutlich ab Gastrulationsstadium 1 beobachten: Die ventralen Zellen flachen sich auf der apikalen Seite ab und es kommt zu den typischen apikalen Konstriktionen. Eine

deutliche Verbesserung der Invagination kann jedoch frühestens ab Gastrulationsstadium 3 beobachtet werden.

### 3) *Der Effekt von 2xPE-sna*

Bei Embryonen mit dem Genotyp *twi*; 2xPE-*sna* sieht man Abflachung und Konstriktion der Apizes bereits in Gastrulationsstadium 0. Eine deutliche Verstärkung der Invagination findet man nur in Gastrulationsstadium 2, die in Gastrulationsstadium 3 nicht mehr gefunden wird.

### 4) *Der kombinierte Effekt von PE-fog und 2xPE-sna*

Wenn man Transgene zusammen in *twist*-Mutanten exprimiert werden, ist bereits in Gastrulationsstadium 1 vollständige Invagination der ventralen Zellen zu beobachten. Dieser Effekt ist erheblich stärker als bei einem der beiden Transgene alleine. Der Effekt hält auch länger an und ist in Gastrulationsstadium 3 noch sichtbar. Auch die Qualität der Invagination ist deutlich besser als bei Expression der einzelnen Transgene: Es bildet sich die für die normale Ventralfurche typische epitheliale Röhre, die entsteht, wenn sich nach der Einstülpung des Mesoderms die Zellen in der apikal-basalen Achse verkürzen und die Apizes der zuletzt invaginierenden Zellen aufeinander treffen und Kontaktflächen miteinander bilden. Ebenso bildet sich bei vielen der tiefen Invaginationen im Zentrum der Röhre ein kleines Lumen aus. Die Morphologie dieser epithelialen Röhren gleicht sehr derjenigen von Ventralfurchen aus Wildtyp-Embryonen. Der Effekt ist sehr deutlich in den Stadien 1 und 2. Diese Struktur kann bei Expression nur eines der beiden Transgene alleine nie beobachtet werden. Zwei Teilprozesse, die charakteristisch für die Invagination des Mesoderms in Wildtyp-Embryonen sind, können in den Rettungsexperimenten nie gefunden werden:

1.) Diejenigen mesodermalen Zellen, die gegen Ende der Invagination dem benachbarten Ektoderm am nächsten liegen, verformen sich normalerweise so, daß sie sich dabei dem Ektoderm entgegenstrecken und einen Kontakt herstellen. Das wird in den Rettungsexperimenten nie beobachtet (Abb. 2.12).

2) In Wildtyp-Embryonen sind die letzten Zellen, die noch invaginieren, ebenso ihre mehr dorsal gelegenen Nachbarzellen, auch in der Schlußphase der Invagination noch



stark abgeflacht. Die Kontaktflächen, die zwischen den Apizes der gegenüberliegenden mesodermalen Zellen entstehen, sind daher gerade und die gemeinsam ausgebildete Kontaktfläche maximal groß. In vielen Schnitten ist diese Struktur als gerade Linie, die senkrecht vom Lumen der epithelialen Röhre aus nach unten verläuft, erkennbar. Die nächsten mehr dorsal gelegenen Twist-positiven Zellen, die nicht invaginieren, zeigen ebenfalls eine starke anhaltende Abflachung ihrer Apizes (Abb. 2.12). Auch dieses Aspekts können nie beobachtet werden, wenn in *twist*-Mutanten *snail* oder *folded gastrulation* im Mesodem exprimiert werden. Die Zellen bleiben selbst bei Expression beider Transgene apikal immer abgerundet und die gerade Kontaktfläche zwischen den gegenüberliegenden mesodermalen Zellen bildet sich nicht aus (Abb. 2.12). In Stadium 3 kann man zwar immer noch die für die späte Invagination typischen Zellformen sehen. Die Röhrenstruktur des invaginierenden Mesoderms ist hier jedoch schon deutlich weniger ausgebildet.

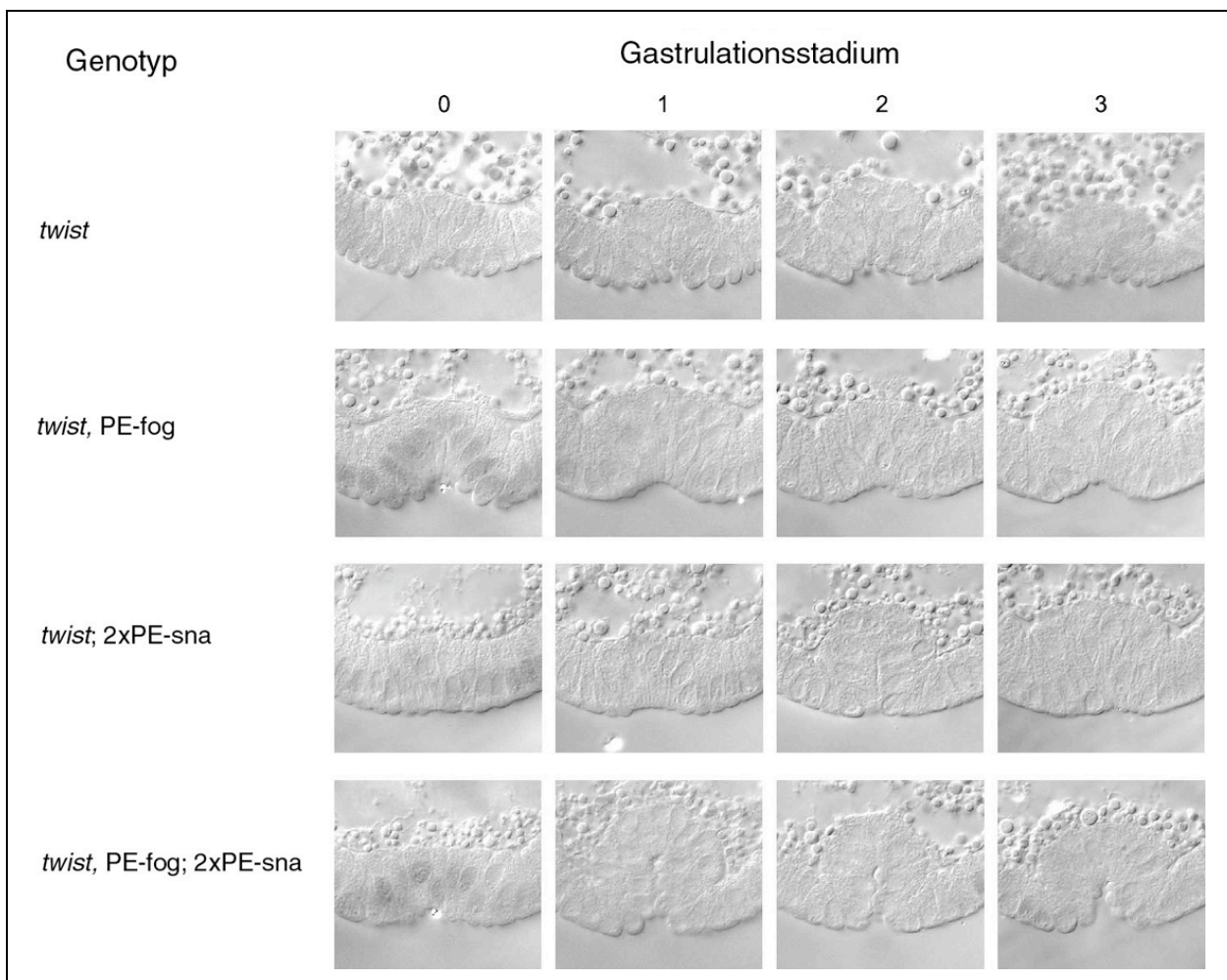




Abb. 2.13: Morphologische Auswertung der Rettungsexperimente für die Gastrulationsstadien 0 bis 3. Die Expression beider Transgene verbessert die Morphologie der Ventralfurche, insbesondere dann, wenn diese simultan exprimiert werden. Einzelheiten im Text.

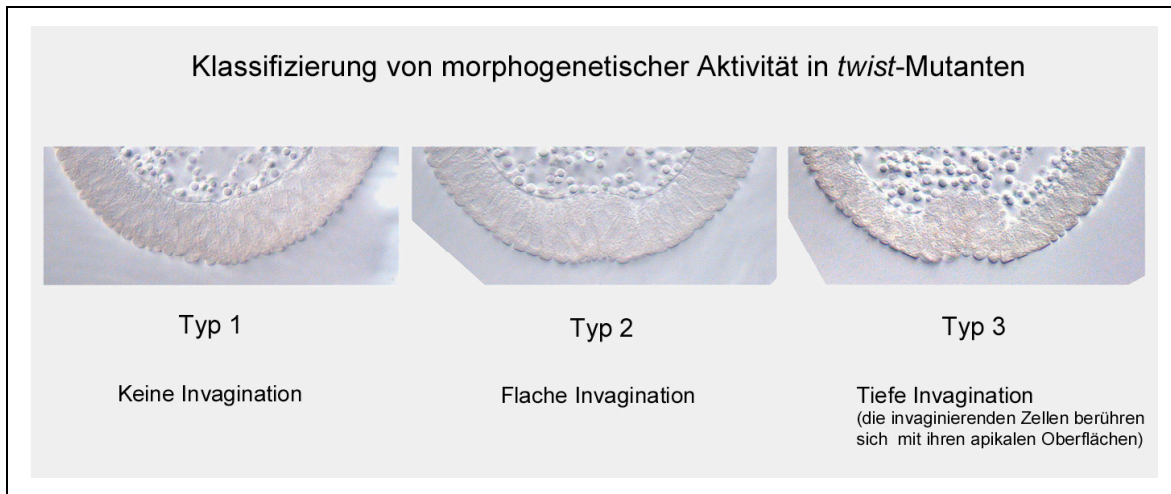
Prinzipiell sind *folded gastrulation* und *snail* also ausreichend um die Invagination der Mesodermanlage zu induzieren. Eine Invagination, die mit der Ventralfurchenbildung in Wildtypen vergleichbar ist, kann dann beobachtet werden, wenn man *sna* und *fog* gemeinsam in Embryonen exprimiert, die mutant für *twist* sind. Die oben genannte Arbeitshypothese wurde somit prinzipiell bestätigt.

### 2.2.3.2 Statistiken der Rettungsexperimente in *twist*-Mutanten

In dem oben dargestellten Ergebnis wurden nur einzelne Schnitte aus einzelnen Embryonen vorgestellt. Eine Gewichtung der Häufigkeit, mit der eine gute oder weniger gute Invagination auftritt, wurde nicht vorgenommen. Um den Einfluss der Transgene in ihrer Gesamtheit zu untersuchen und nicht nur basierend auf dem Vergleich der Situationen, in denen jeweils die stärkste Morphogenese beobachtet werden kann, erfolgte eine zusätzliche statistische Auswertung. Dafür wurde von allen Genotypen eine kleine Anzahl an Embryonen der Gastrulationsstadien 0 bis 3 geschnitten und statistisch ausgewertet. Wie bei der Analyse der *twist*-Mutanten wurde nur der Kernbereich entlang der Embryonen berücksichtigt. Um eine Gewichtung vornehmen zu können, mußte die „Qualität“ der Invaginationen bewertet werden. Dazu wurden alle Schnitte in verschiedene „Invaginationklassen“ einsortiert und ausgezählt. Diese Invaginationsklassen wurden nach morphologischen Kriterien definiert (Abb. 2.14):

- *Klasse I* bezeichnet die Morphologie von Schnitten, in denen keine Ansätze von Zellformänderungen sichtbar sind und auch keine Ventralfurche erkennbar ist.
- In *Klasse II* wurden solche Invaginationen einsortiert, die maximal eine kleine Furche bilden und Zellformänderungen klar sichtbar sind;
- *Klasse III* steht für Invaginationen, in denen die ventralen Zellen deutlich invaginieren und die Apizes gegenüberliegender

invaginierender Zellen sich berühren und Kontakte miteinander bilden.



**Abb. 2.14:** Die Kriterien, die zur statistischen Analyse der Rettungsexperimente gebildet wurden. Erläuterungen siehe Text.

Die zentralen Schnitte aller Genotypen und aller Stadien wurden am Mikroskop begutachtet und ausgezählt. Anschließend wurde für jeden Genotyp die Häufigkeit eines der drei Invaginationstypen gegen die Gastrulationsstadien aufgetragen (Abb. 2.15:).

In *twist*-Mutanten können starke Invaginationen anfänglich (Stadien 0 und 1) nicht beobachtet werden. Ihre Häufigkeit nimmt erst ab Stadium 2 zu. Es gibt hier insgesamt einen Anstieg der morphogenetischen Aktivität mit fortschreitendem Alter der Embryonen.

Wird *snail* in der Mesodermanlage von *twist*-Mutanten exprimiert, kommt es zu einem starken Anstieg von Typ III-Invaginationen in Stadium 2. Dieser Effekt ist im darauffolgenden Stadium nicht mehr nachweisbar. Die Häufigkeit von Typ II-Invaginationen ändert sich im Vergleich mit *twist*-Mutanten kaum.

Bei Expression von *folded gastrulation* im Mesodermprimordium von *twist*-Mutanten ergibt sich ein deutlicher Anstieg von Typ II-Invaginationen über alle untersuchten Stadien hinweg. Typ I-Invaginationen treten fast nur noch in Stadium 0 auf. Die Häufigkeit von Typ III-Invaginationen kann nur im Stadium 3 beobachtet werden.

Bei simultaner Expression beider Transgene läßt sich ein starker Anstieg der Häufigkeit von Typ III-Invaginationen feststellen. In Stadium 1 findet man in *twist*-

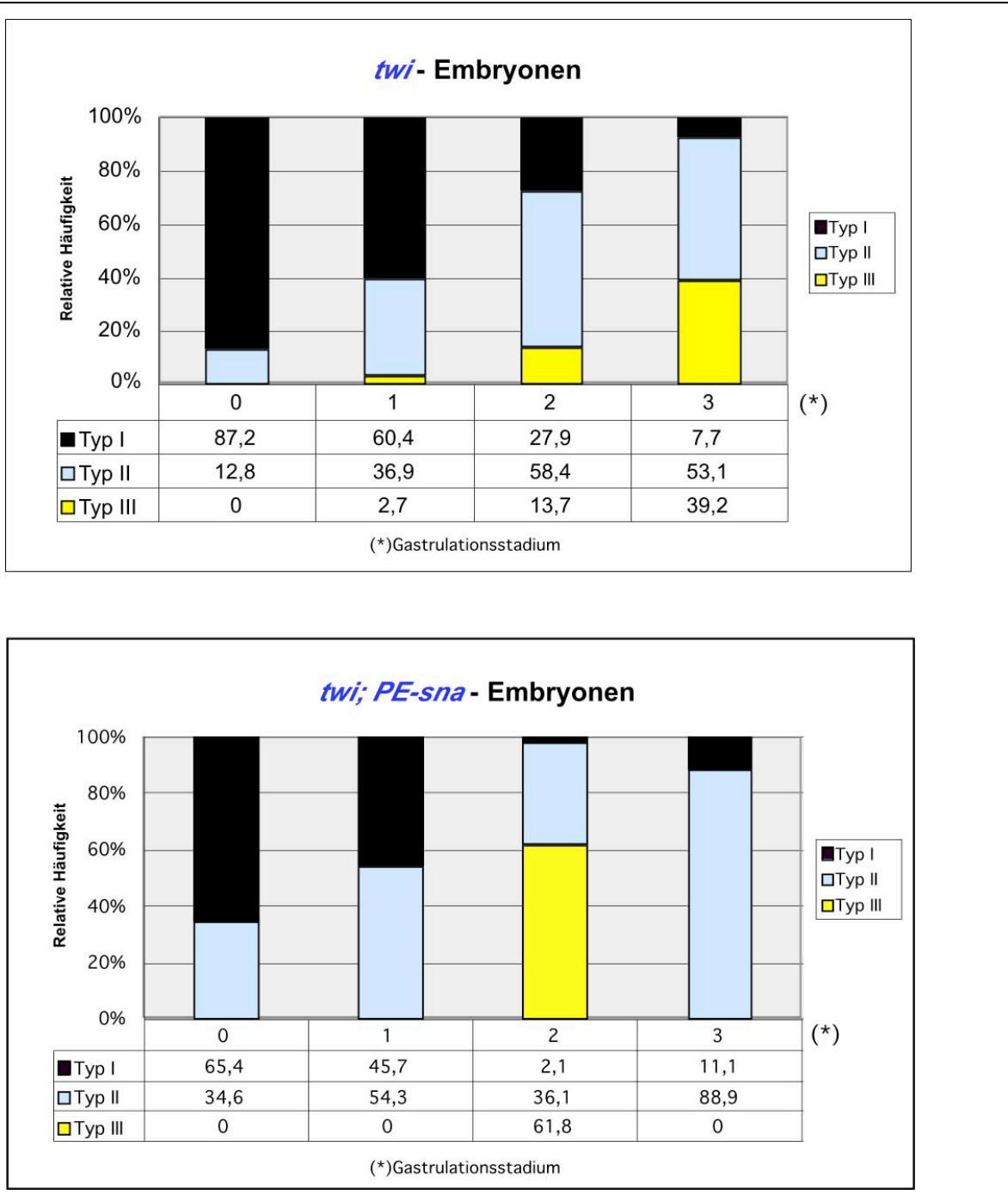
Mutanten oder bei Expression eines der beiden Transgene alleine nahezu keine Invaginationen der Klasse III. Werden *snail* und *folded gastrulation* gemeinsam in *twist*-Mutanten exprimiert, fallen 70% aller Invaginationen in Klasse III. Dieser hohe Wert bleibt annähernd über die Stadien 1 bis 3 erhalten.

Die statistische Auswertung der Rettungsexperimente bestätigt deutlich den Einfluß der Transgene auf die Ventralfurchenbildung in *twist*-Mutanten. Jedes Transgen einzeln führt bereits zu einer Erhöhung der morphogenetischen Aktivität. Es ist auffällig, daß die Expression von *folded gastrulation* vor allem zu einem Anstieg der Typ II-Invaginationen führt.

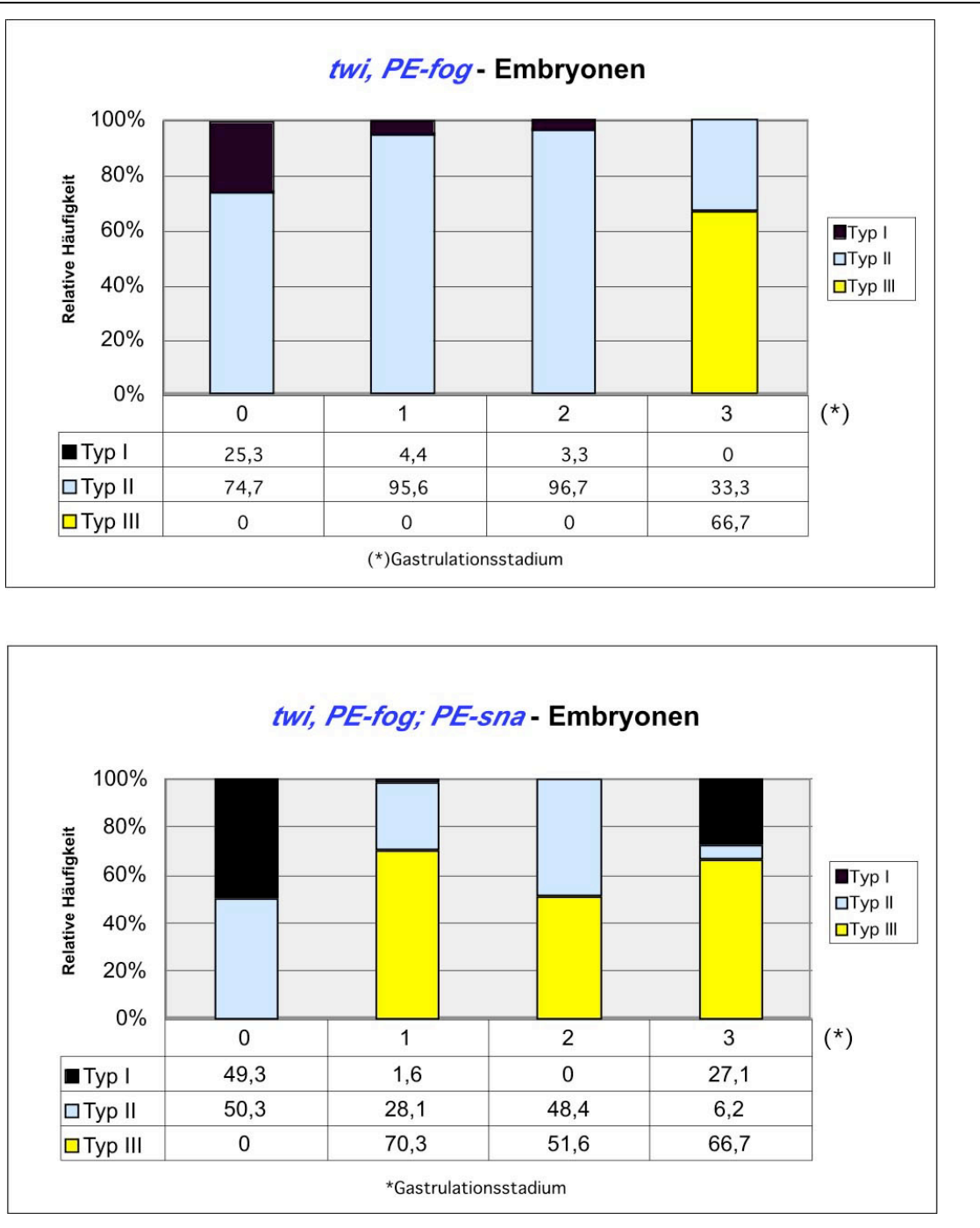
Die Expression von *snail* bewirkt in *twist*-Mutanten nur in einer kurzen Phase einen Anstieg von Typ III-Invaginationen. Expression beider Transgene führt zu einem starken Anstieg von Typ III-Invaginationen, der über die folgenden Stadien anhält.

Selbst wenn *snail* und *folded gastrulation* zusammen exprimiert werden findet man jedoch nur in Einzelfällen, daß die Rettung entlang der gesamten Ventralfurche gleichmäßig gut ist. In anderen Embryonen findet man nur regional begrenzt eine solch gute Invagination, während mehr posterior oder mehr anterior die Invagination weniger tief ausfallen kann. Eine weitere Einschränkung betrifft den zeitlichen Ablauf und die Geschwindigkeit der Invagination in *twi*, *PE-fog*; *2xPE-snail* Embryonen. Selbst in den am besten geretteten Fällen findet die Invagination der ventralen Zellen um einige Minuten später statt als in Wildtyp-Embryonen - was für den Prozess der Gastrulation in *Drosophila* eine deutliche Verzögerung darstellt.

Das heißt: *snail* und *folded gastrulation* sind - trotz fehlender *twist*-Funktion - in der Lage, die Invagination der mesodermalen Zellen im Blastodermembryo zu steuern. Die induzierten Ventralfurchen erreichen allerdings nicht die Geschwindigkeit, die Dynamik und die Gleichmäßigkeit, die man während der Ventralfurchenbildung in Wildtyp-Embryonen beobachten kann.



**Abb. 2.15 a:** Statistische Auswertung der Morphologie der Mesodermanlage in *twist*- und *twist; 2xPE-sna*-Embryonen. Die Morphologie in den untersuchten Schnitten der verschiedenen Genotypen wurde den definierten Invaginationsklassen zugeordnet und nach Gastrulationsstadien getrennt aufgetragen. Details im Text.



**Abb. 2.15 b:** Statistische Auswertung der Morphologie der Mesodermanlage in *twist*, *PE-fog* und *twist*, *PE-fog*; *2xPE-sna*-Embryonen. Die Morphologie in den untersuchten Schnitten der verschiedenen Genotypen wurde den definierten Invaginationsklassen zugeordnet und nach Gastrulationsstadien getrennt aufgetragen. Details im Text. Man beachte vor allem die Unterschiede in Stadium 1 von *twist*, *PE-fog*; *2xPE-sna*-Embryonen im Vergleich zu den anderen Genotypen.

### 2.2.3.3 Beurteilung der Transgene

Für die Bewertung der vorgestellten Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, ob die beiden verwendeten Transgene in ausreichendem Maße in der Lage sind, die Funktion der Zielgene von *twist* wiederherzustellen.

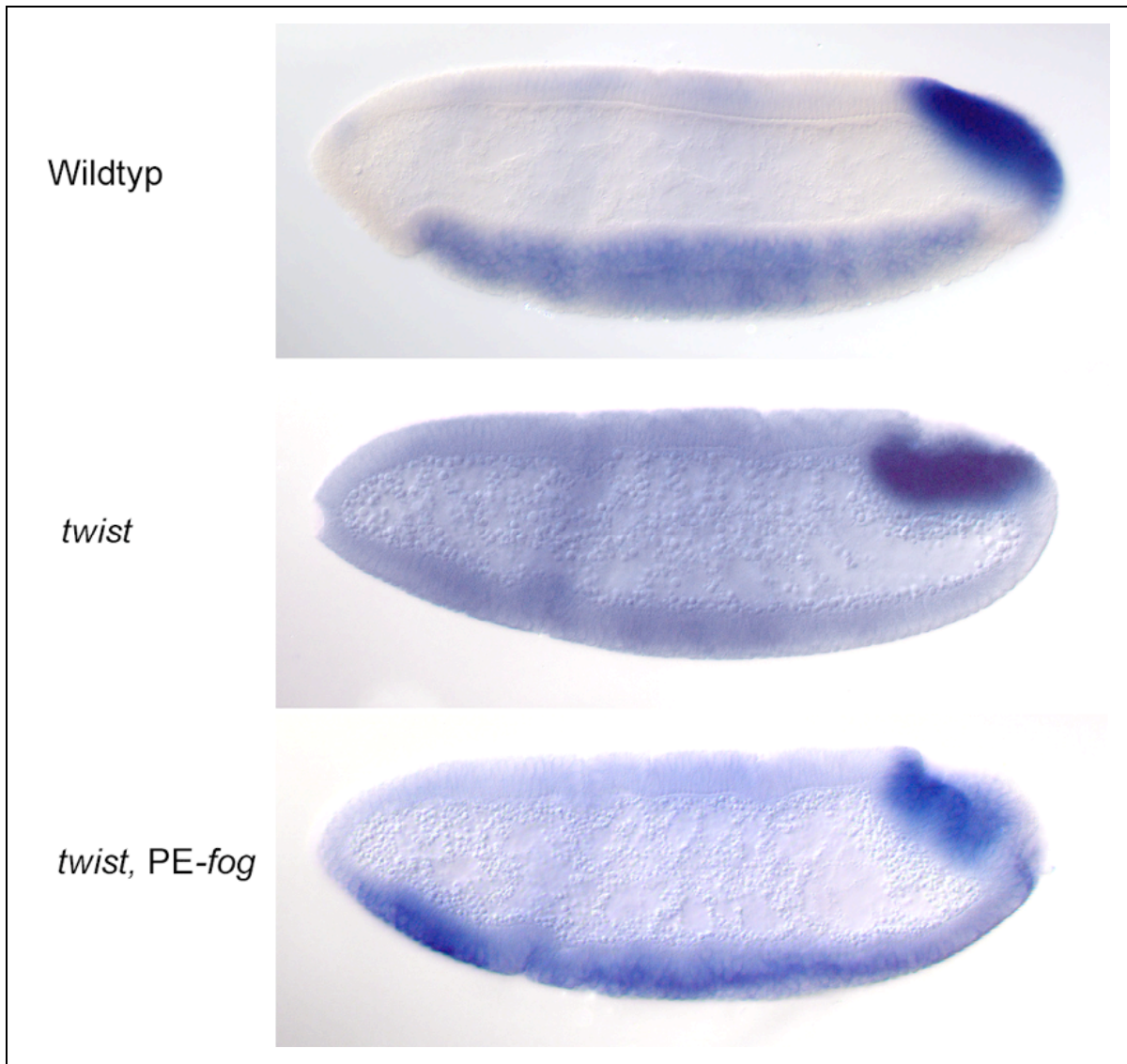
Das 2xPE-*snail*-Konstrukt wurde in Rettungsexperimenten getestet. Dazu wurde es in einen Stamm eingekreuzt, der heterozygot für eine Deletion ist, die unter anderem *snail* entfernt. Der resultierende Genotyp war der folgende:

w; *Df(2L)osp29*; 2xPE-*snail*. Von diesem Stamm wurden Embryonen gesammelt und in diesen die Ventralfurchenbildung untersucht. Es wurden keine Embryonen mit Gastrulationsdefekten gefunden. Mit Hilfe von in situ-Hybridisierungen wurde nachgewiesen, daß *snail* in allen Embryonen ab Ende der Zellularisierung exprimiert ist. Zur Kontrolle wurde das Transgen wieder ausgekreuzt und gegen heterozygote *Df(2L)osp29*-Fliegen zurückgekreuzt:

*Df(2L)osp29/+* ; 2xPE-*snail/+* X *Df(2L)osp29/CyO* .

Embryo-Ablagen dieser Kreuzung wurden mit Hilfe von anti-Twist-Färbungen auf Gastrulationsdefekte untersucht. Es wurden Embryonen gefunden, die keine Ventralfurche bildeten. Bei diesen mußte es sich um homozygot mutante *snail*-Embryonen handeln. Damit wurde bestätigt, daß in den vorherigen Rettungsexperimenten die *snail*-Defizienz vorhanden war. Daraus konnte also geschlossen werden, daß die beobachtete Rettung kein Artefakt war, und daß das 2xPE-*snail*-Rettungskonstrukt in der Lage ist, den Ventralfurchenphänotyp von *snail*-Mutanten völlig zu kompensieren.

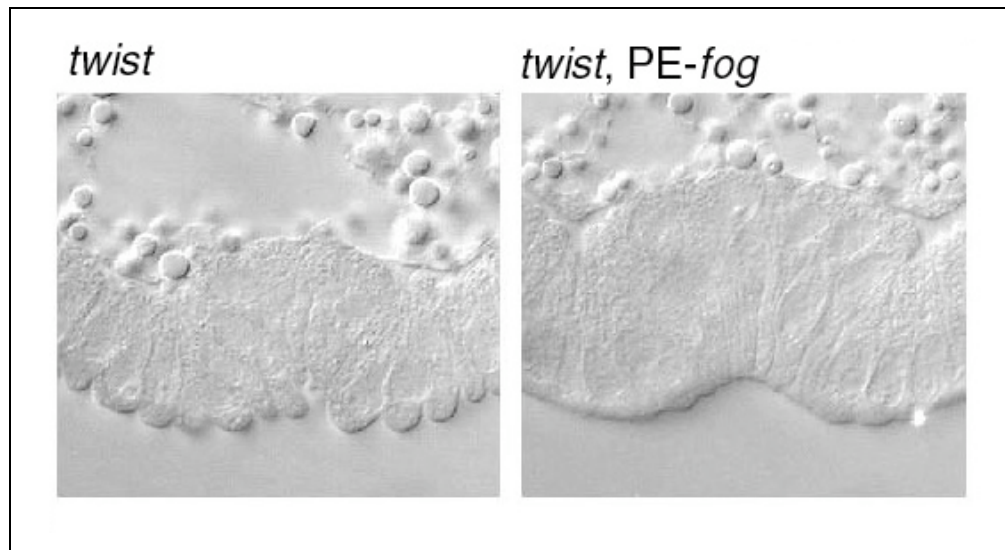
Das PE-*fog* Konstrukt wurde phänotypisch und auf seine Expression hin untersucht (Abb. 2.17). Mit in situ-Hybridisierungen wurde gezeigt, daß in Embryonen, die von dem Stamm *twi*, PE-*fog/CyO* stammten und mutant für *twist* waren, *folded gastrulation* vor und während der Gastrulation in der Mesodermanlage exprimiert ist. Um die Expressionsstärke zu beurteilen, wurde die mesodermale Expression von *folded gastrulation* mit der Expression im Bereich der Mitteldarmanlage verglichen.



**Abb. 2.16:** Die Expression von *folded gastrulation* unter Kontrolle des PE-Promotors. In *twist*-Mutanten kann auf diese Weise die Expression von *folded gastrulation* im Mesoderm wiederhergestellt werden.

Diese ist in Wildtypen wesentlich stärker als die Expression von *folded gastrulation* in der Mesodermanlage (Abb. 2.16). In Embryonen des Genotyps *twi*, PE-*fog* entspricht das Verhältnis der Expressionsstärken von *folded gastrulation* in den beiden Primordien der Situation von Wildtyp-Embryonen. Phänotypisch wurde die Expression von *folded gastrulation* in *twist*-Mutanten auf ein einziges Kriterium hin untersucht: Ist die Expression von *folded gastrulation* in der Lage, in *twist*-Mutanten die apikale

Abflachung der Zelloberflächen und apikale Konstriktionen zu bewirken, wie dies für andere *folded gastrulation*-Konstrukte publiziert wurde (Morize et al., 1998). Wie in der Auswertung der Rettungsexperimente schon berichtet, ist dies der Fall. Man kann den Effekt besonders deutlich feststellen, wenn man *twist*-Mutanten mit Embryonen des Genotyps *twi*, PE-*fog* vergleicht (Abb. 2.17). Aus beiden Ergebnissen wurde daher geschlossen, daß das PE-*fog*-Konstrukt voll funktionsfähig ist.



**Abb. 2.17:** PE-*fog* induziert in *twist*-Mutanten Zellformänderungen. Typisch für *Twist*-Mutanten sind die in Schnitten erkennbaren runden Apizes der mesodermalen Zellen. PE-*fog* kann in *twist* Mutanten apikale Abflachungen und auch Konstriktionen der Apizes induzieren.

Aus der Bewertung der Transgene und den Ergebnissen der Experimente, in denen mit Hilfe dieser Transgene die Ventralfurchenbildung wiederhergestellt werden sollte, ergibt sich die Schlußfolgerung, daß, wenn *snail* und *folded gastrulation* die einzigen Zielgene von *twist* wären, die angestrebte Rettung der Mesodermmorphogenese besser hätte ausfallen müssen. *snail* und *folded gastrulation* verbessern den Prozess der Mesoderminvasion in *twist*-Mutanten zwar erheblich, aber ihre Aktivität reicht offensichtlich nicht dazu aus, die Funktion von *twist* völlig zu ersetzen.



### 2.3. Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle des Gens *snail* während der Ventralfurcbenbildung

Aus zwei Gründen beschloß ich, auch die Rolle von *snail* näher zu untersuchen: Zum einen rückte das Ergebnis, daß *snail* und *folded gastrulation* alleine für eine Invagination des Mesoderms sorgen können, *snail* in das Zentrum des Interesses (Kap. 2.2): In *twist*-Mutanten exprimiert kann *folded gastrulation* alleine keine Invagination induzieren, kommt aber die Aktivität von *snail* hinzu, führt dies zu einer Invagination.

Zum anderen kann der Phänotyp von *snail*-Mutanten bisher nicht erklärt werden. Es wurde zwar gezeigt, daß *snail* eine Vielzahl von Genen, die im Ektoderm exprimiert sind, im Mesoderm reprimiert, jedoch wurde bislang kein Gen identifiziert, dessen Repression im Mesoderm essentiell ist (s. Einleitung). Daraus ergab sich die Fragestellung: Gibt es ein solches Zielgen, dessen Repression im Mesoderm für die Ventralfurcbenbildung essentiell ist? Hinzu kommt, daß - im Gegensatz zu *twist* - die Reduzierung der Gendosis von *snail* um die Hälfte schon zu einer deutlich sichtbaren Verzögerung der Invagination des Mesoderms führt (Abb. 2.21). Dies mag zwar nur ein Hinweis darauf sein, daß die Zielgene von *snail* und *twist* unterschiedlich empfindlich auf ihre Regulatoren reagieren, aber es zeigt, daß für eine ungestörte Ventralfurcbenbildung beide Kopien von *snail* funktionsfähig sein müssen.

#### 2.3.1 Die Zielgene von *snail*

In der Vergangenheit wurden durch eine Reihe von Arbeiten zahlreiche Gene identifiziert, die von *snail* im Mesoderm reprimiert werden (s. Tab. 1). Alle diese Gene sind im Wildtyp entweder im Ektoderm oder im Mesektoderm exprimiert. Ihrer Funktion nach lassen sich diese Gene in drei Gruppen einteilen:

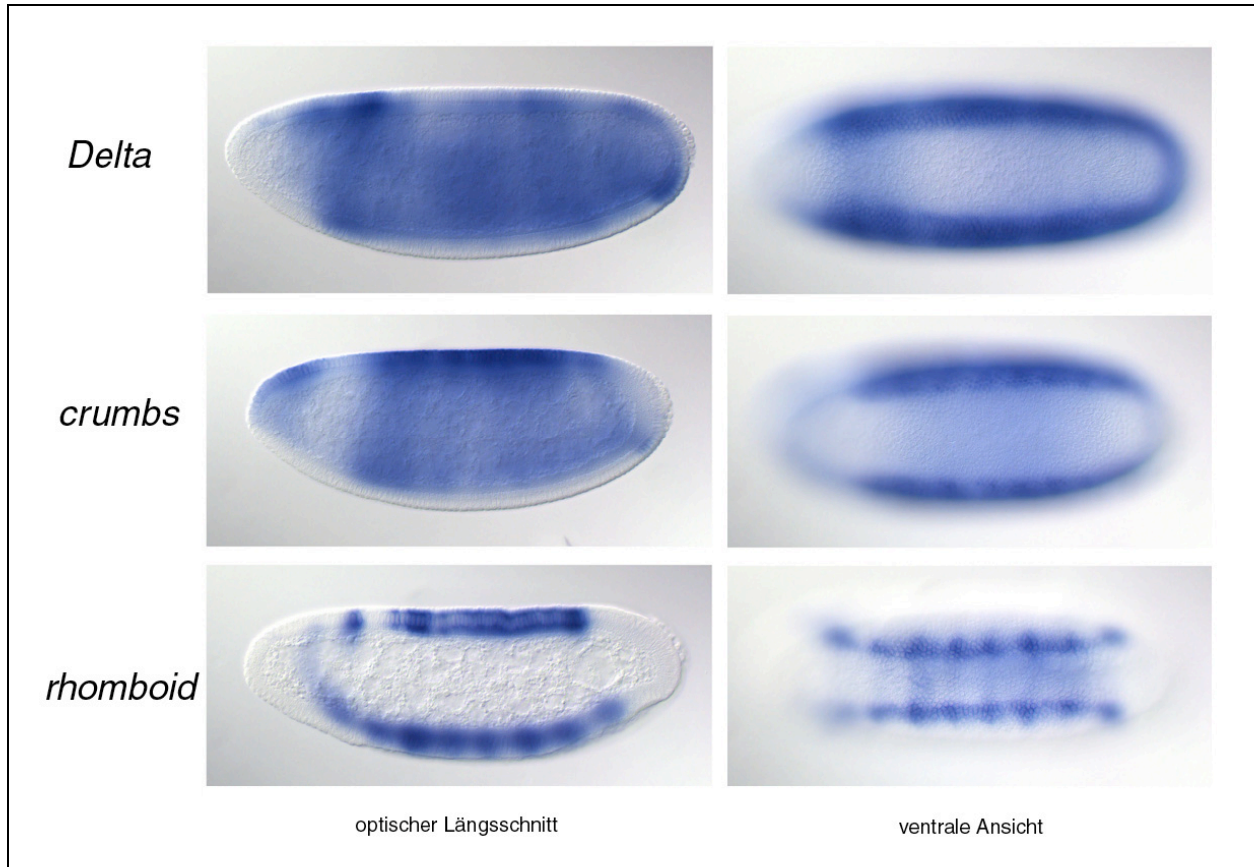


Abb. 2.18: Drei Zielgene von *snail*. *Delta* und *crumbs* sind nahezu ubiquitär exprimiert-außer im Mesoderm. *snail* reprimiert dort ihre Expression, wie man den ventralen Ansichten entnehmen kann. s. auch Abb. 2. 19.

- 1) Gene, die für die Spezifizierung der Neuroblasten und die frühe Entwicklung des Nervensystems notwendig sind (die überwiegende Mehrheit dieser Gene kodiert für Transkriptionsfaktoren).
- 2) Gene, die für die Musterbildung im Ektoderm notwendig sind und für die Differenzierung ektodermaler Zellen.
- 3) Gene, die direkt die Eigenschaften einer Zelle wie Polarität oder Adhäsion bestimmen.

Der Nachweis, daß es sich bei einem Gen um ein Zielgen von *snail* handelt, erfolgte in den meisten Arbeiten durch die Analyse von in situ-Hybridisierungen des entsprechenden Gens in Embryonen, die homozygot mutant für *snail* sind. Bei Verlust

der Aktivität von *snail* läßt sich in allen Fällen beobachten, daß sich die Expressionsdomäne der betreffenden ektodermalen Gene nach ventral in die mesodermale Anlage hinein ausweitet. In einzelnen Fällen konnte auch gezeigt werden, daß Snail direkt an spezifische Sequenzen im Promotor eines Gens bindet und dadurch die Transkription des betreffenden Gens unterdrückt (Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992). Das bisher am besten charakterisierte Beispiel ist das Gen *rhomboid*. Der Promoter von *rhomboid* wurde eingehend untersucht. Neben Bindungsstellen für Dorsal und bHLH-Proteine wurden mehrere Bindungsstellen für Snail nachgewiesen (Bier et al., 1990; Ip et al., 1992). Modifiziert man die Bindungsstellen für Snail oder platziert sie in größerer räumlicher Distanz von den Aktivatorsequenzen, geht die Repression von *rhomboid* im Mesoderm verloren (Ip et al., 1992)). Die resultierende Expression entspricht derjenigen von *rhomboid* in *snail*-Mutanten.

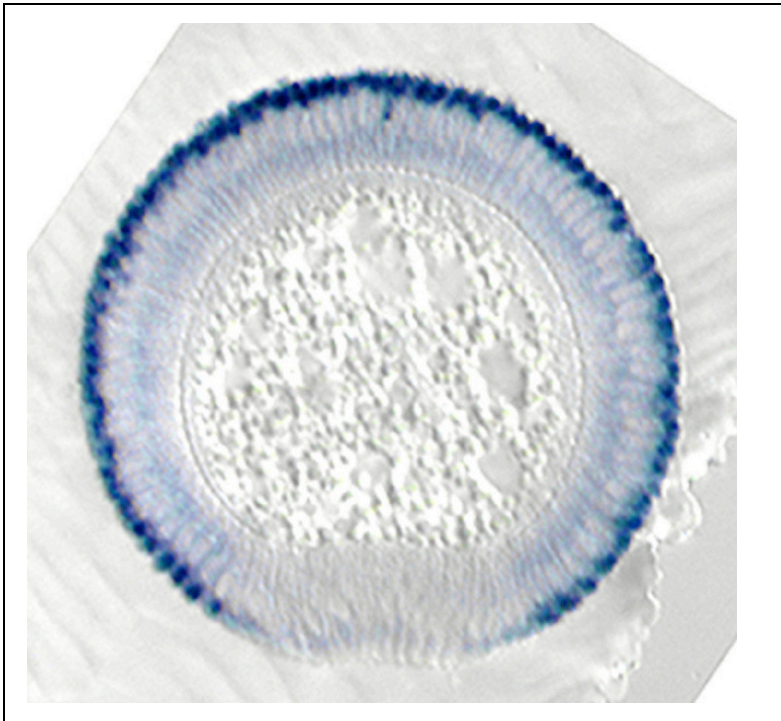
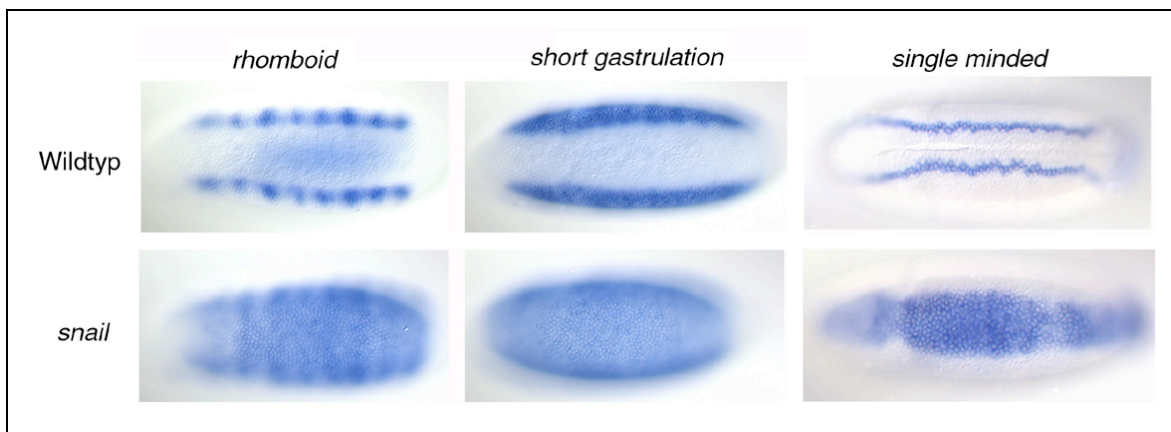


Abb. 2.19: Expression von *crumbs* in einem Wildtyp-Embryo zu Beginn der Ventralfurchenbildung.

Beispiele für Expressionsmuster bekannter Zielgene von *snail* und ihre Repression im Mesoderm sind in Abb. 2.19-2.21 gezeigt. Für zwei der in Tab. 1

aufgelisteten Gene war bisher nicht untersucht worden, ob sie auch Zielgene von *snail* sein könnten (*stardust*, *ventral nervous system defective*). Von 13 der aufgeführten Gene wurden mit Digoxigenin markierte RNA-Sonden hergestellt und die Expression der betreffenden Gene in *snail*-Mutanten untersucht. Es zeigt sich, daß auch diese in Abhängigkeit von *snail* im Mesoderm reprimiert werden. Bei jedem der untersuchten Gene weitet sich in Abwesenheit der Aktivität von *snail* dessen Expressionsdomäne zur Mesodermanlage hin aus. Beispiele sind in Abb. 2.21 gezeigt. Aufgrund der Expressionsdaten müssen auch *stardust* und *ventral nervous system defective* als Zielgene von *snail* angesehen werden.



**Abb. 2.20:** Drei Zielgene von *snail*. Solange die Aktivität von *snail* im Mesoderm vorhanden ist, werden *rhomboid*, *sog* und *single minded* im Mesoderm reprimiert. In Null-Mutanten von *snail* dehnt sich ihre Expressionsdomäne bis in die Mesodermanlage aus.

### 2.3.2 Misexpression von Zielgenen von *snail* in der Mesodermanlage

Die Frage, ob die Rolle von Snail als Repressor im Mesoderm für die Ventralfurchenbildung notwendig ist, kann genetisch untersucht werden. Dazu werden Zielgene von *snail* ektopisch im Mesodermprimordium exprimiert, und die Auswirkung auf die Ventralfurchenbildung analysiert. Dies läßt sich auf zwei Wegen erreichen:

Zum einen können mit Hilfe von mutanten *snail*-Allelen Situationen geschaffen werden, in denen das repressive Potential von *snail* verschieden stark geschwächt wird. Auf diese Weise kommt es zur Derepression von einzelnen der Zielgene von *snail*.

Zum anderen können Zielgene von *snail* gezielt mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems in verschiedenen Bereichen und Entwicklungsstadien des Embryos überexprimiert werden. Die Wildtyp-Kopien der Zielgene werden zwar weiterhin von Snail reprimiert, auf den Mechanismus, der zur Überexpression führt (Gal4/UAS), hat Snail jedoch keinen Einfluß.

Beide Wege wurden verfolgt und die Auswirkungen für die Expression der Zielgene im Bereich der Mesodermanlage als auch für die Morphogenese analysiert. Für die Untersuchung der Expression anhand von in situ-Hybridisierung an Embryonen wurden von 13 Zielgenen von *snail* Dig-markierte RNA-Sonden hergestellt (s.Tab 1). Für die Gene *bazooka* und *nullo* (Hunter and Wieschaus, 2000; Postner and Wieschaus, 1994), wurden ebenfalls RNA-Sonden produziert und durch in situ-Hybridisierung auf Wildtyp Embryonen getestet. In beiden Fällen wurden keine Anhaltspunkte für mesodermspezifische Repression gefunden.

#### **Tabelle 1: Gene, deren Expression in der Mesodermanlage durch *snail* reprimiert wird**

△: von diesen Genen wurden keine Dig-markierten RNA-Sonden hergestellt

\*: für diese Gene lagen bisher keine Daten vor, die sie als Zielgene von Snail ausweisen würden

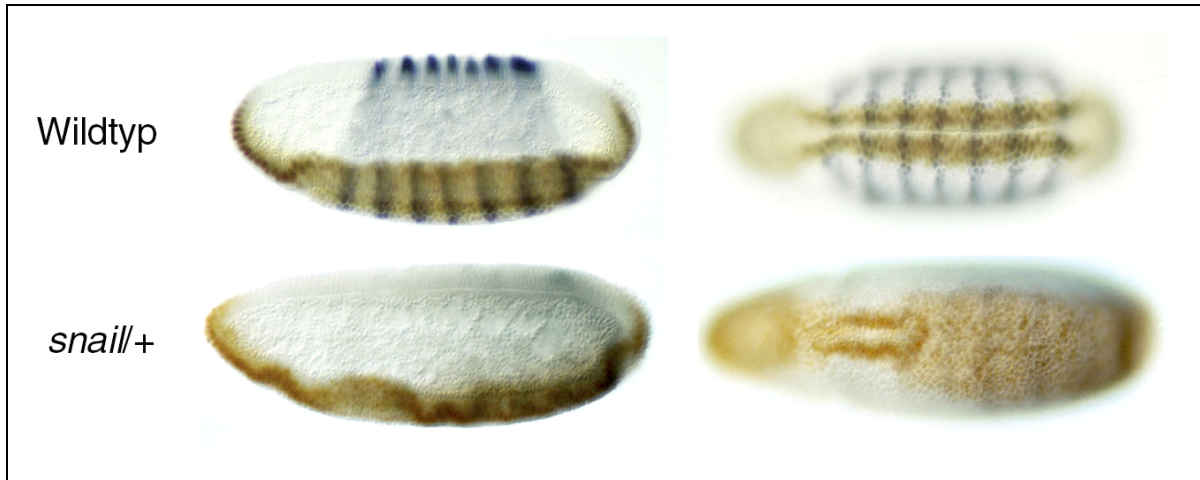
#### **Abkürzungen:**

|       |  |
|-------|--|
| bHLH  | Protein mit basische m Helix-Loop-Helix Motiv      |
| EGF-R | EGF-Rezeptor                                       |
| MAGUK | membran-assoziierte Guanylat-Kinase                |
| PAS   | Dimerisierungsdomäne (nach Per, Arnt, Sim benannt) |
| PDZ   | Protein-Protein-Interaktionsdomäne                 |
| TF    | Transkriptionsfaktor                               |
| TMP   | Transmembranprotein                                |

| Name  | Rolle in der Entwicklung                        | Protein   | Referenz  |
|---|---|---|---|
| <i>lethal of scute</i>  | Neurogenese                                     | TF, bHLH  | (Skeath and Carroll, 1994)  |
| <i>achaete</i>  | Neurogenese                                     | TF, bHLH  | (Skeath and Carroll, 1994)  |
| <i>scute</i>  | Neurogenese                                     | TF, bHLH  | (Skeath and Carroll, 1994)  |
| <i>Delta</i>  | Neurogenese                                     | TMP, N-Rezeptor-Ligand,                                   | (Bender et al., 1993; Kopeczynski and Muskavitch, 1989)           |
| <i>Enhancer of split</i> <sup>Δ</sup>                             | Neurogenese                                     | TF, bHLH  | (Corbin et al., 1991)   |
| <i>mastermind</i> <sup>Δ</sup>                                    | Neurogenese, Mesektodermspezifizierung?         | TF, reduzierte Expression im Mesoderm währ. d. Gastrulat. | (Bettler et al., 1991; Corbin et al., 1991; Smoller et al., 1990) |
| <i>single-minded</i>  | Mesektodermspezifizierung, Gliazell-Entwicklung | TF, bHLH-PAS-Klasse                                       | (Crews et al., 1988; Kasai et al., 1992; Nambu et al., 1990)      |
| <i>ventral nervous system defective</i> <sup>*</sup> / <i>NK2</i> | Musterbildung im Neuro-Ektoderm, Neurogenese    | TF, Homeodomänprotein                                     | (Jimenez et al., 1995; Skeath et al., 1994)                       |
| <i>rhomboid</i>   | Musterbildung im Ektoderm                       | TMP, Ser-Protease, generiert Ligand für EGF-R             | (Bier et al., 1990; Ip et al., 1992)                              |
| <i>short gastrulation</i>   | Musterbildung im Ektoderm, Zell-Adhäsion        | TMP, Wachstumsfaktor, Chordin-Homolog                     | (Biehs et al., 1996)  |
| <i>brinker</i>  | Musterbildung im Ektoderm                       | TF  | (Jazwinska et al., 1999a)   |
| <i>crumbs</i>   | Zellpolarität, Zell-Adhäsion                    | TMP, LamininA-Homolog                                     | (Grawe et al., 1996)  |
| <i>shotgun</i>  | Zell-Adhäsion, Rolle in EMTs                    | TMP, E-Cadherin,  | (Tepass et al., 1996)   |
| <i>stardust</i> <sup>*</sup>                                      | Zellpolarität                                   | PDZ-Domänen-MAGUK,  | (Bachmann et al., 2001; Grawe et al., 1996)                       |
| <i>PS1/mew</i>  | keine frühe Rolle, Flügel-Entwicklung           | alpha-Integrin-Unterein., Zell-Adhäsions-Rezeptor         | (Brower et al., 1995; Celenza and Carlson, 1989)                  |



### 2.3.2.1 Situationen mit verminderter repressiver Kapazität von *snail*



**Abb. 2.21:** Reduzierung der Gendosis von *snail* führt zu einem schwachen morphologischen Defekt bei der Ventralfurchenbildung, wie man sowohl in den optischen Längsschnitten (links) als auch in der ventralen Ansicht sehen kann (rechts). Die Wildtyp-Embryonen wurden gegen Twist (braun) und Even-skipped (blau) gefärbt. Die *snail*-Heterozygoten wurden gegen Twist und gegen beta-Galaktisidase gefärbt, um heterozygot mutante Embryonen von homozygot mutanten unterscheiden können.

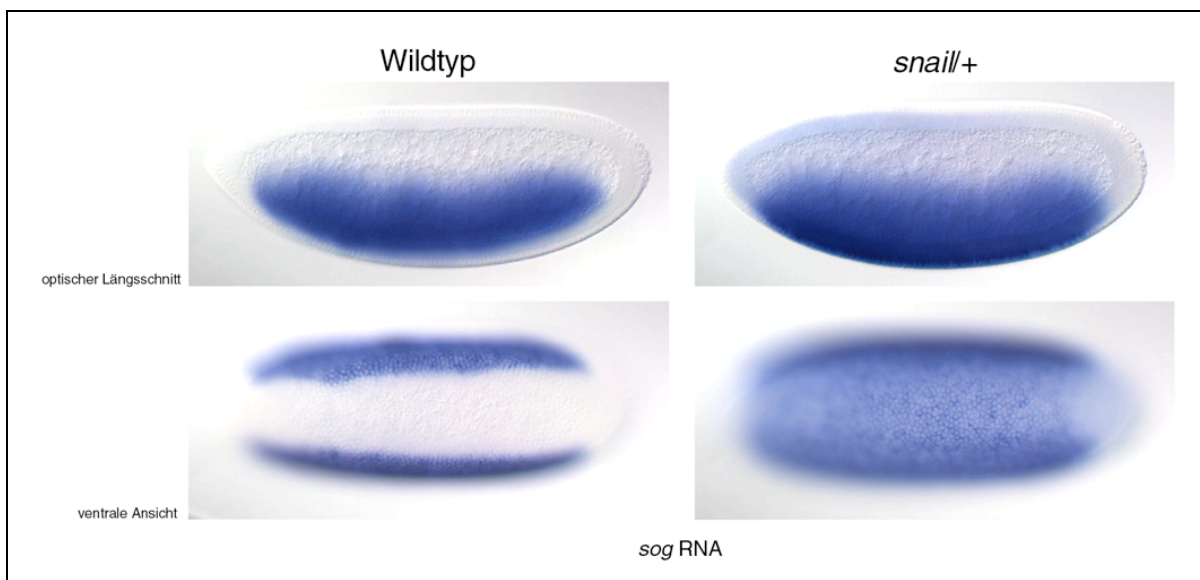
#### A *snail*-Heterozygote

Wie schon beschrieben, hat die Reduzierung der Gendosis von *snail* um die Hälfte zur Folge, daß die Invagination des Mesoderms sich verlangsamt und ungleichmäßiger als im Wildtyp erfolgt (s.Abb. 2.21). Dies wurde von mir bisher nur morphologisch ausgewertet. Untersucht man mit Dig-markierten RNA-Sonden die Expression der Zielgene von *snail*, so läßt sich nachweisen, daß einige der Zielgene nicht mehr von Snail reprimiert werden, sondern im Bereich der Mesodermanlage exprimiert sind. Dies ließ sich für *rhomboid*, *ventral nervous system defective* und *short gastrulation* eindeutig zeigen. Möglicherweise gilt dies auch für *shotgun*. Die entsprechende Färbung war

jedoch nicht eindeutig beurteilbar. Ein möglicher Effekt fällt hier vermutlich nur schwach aus.

Alle anderen untersuchten Gene zeigten in *snail*-Heterozygoten die Wildtypexpression. (s.Abb. 2.22)

Die Ergebnisse verdeutlichten, daß für die volle Aktivität von *snail* beide seiner Kopien funktionsfähig sein müssen. Die Reduzierung der Gendosis um die Hälfte führt bereits zur Derepression einiger Zielgene im Mesoderm und korreliert mit einem schwachen Defekt bei der Ventralfurchenbildung.



**Abb. 2.22:** Derepression in *snail*-Heterozygoten. Mehrere der Zielgene von *snail* sind in *snail*-Heterozygoten nicht länger vollständig reprimiert. Als Beispiel ist hier die Expression von *short gastrulation* gezeigt.

## B Interaktionen von *snail* mit seinem Co-Repressor dCtBP

Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, agiert Snail mit Hilfe des Co-Repressors dCtBP, der direkt an Snail bindet (Chinnandurai, 2002; Nibu et al., 1998a; Nibu et al., 1998b). dCtBP ist auch der Co-Repressor anderer Repressoren, wie Krüppel und Knirps (Nibu et al., 1998a; Poortinga et al., 1998). Eine Reduzierung der Dosis von dCtBP um



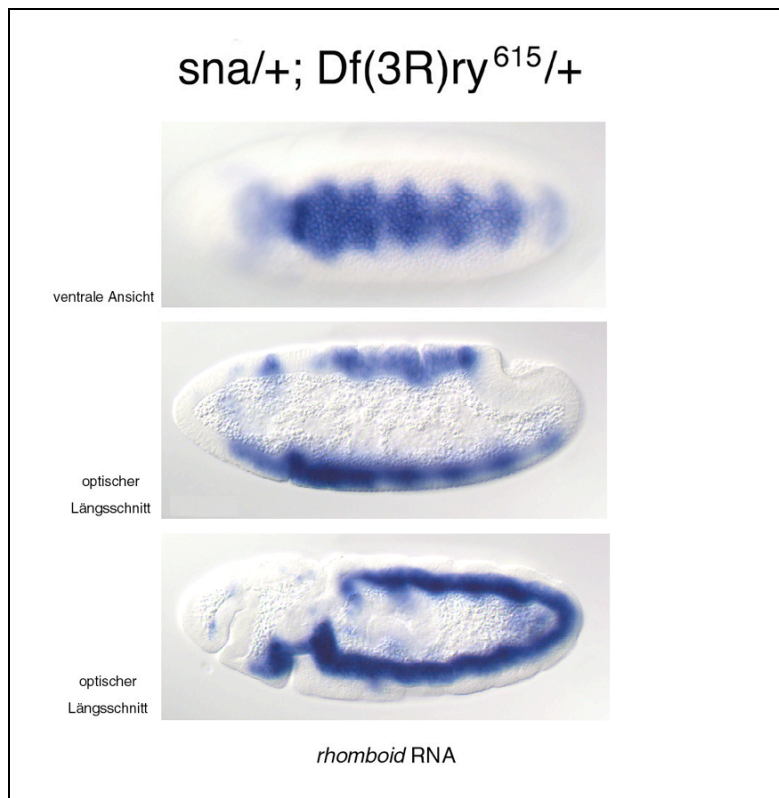
die Hälfte bei gleichzeitiger Halbierung der zygotischen Expression von *knirps* phänotypisiert den Phänotyp der Verlustmutation von *knirps* (Nibu et al., 1998b). Diese Experimente wurden mit zwei *dCtBP*-Allelen und einer Defizienz (*Df(3R)ry<sup>615</sup>*), die *dCtBP* aufdeckt, wiederholt und mit doppelt-heterozygoten *snail/+*; *dCtBP/+* verglichen. Doppelt-heterozygote Embryonen wurden mit Hilfe von Even-skipped-Antikörperfärbungen (eins der Zielgene von *knirps*) auf Veränderungen der Repression von *knirps* und mit Hilfe von Twist-Antikörperfärbungen auf morphologische Defekte untersucht. Zusätzlich wurden auch Transheterozygote dieser *dCtBP*-Allele mit einer Deletion, die *snail* entfernt, erzeugt und auf Morphologie und Expressionsmuster von *snail*-Zielgenen untersucht.

Die genetische Interaktion von *dCtBP* mit *knirps* fällt anders aus als diejenige von *knirps* mit *snail*. *dCtBP/knirps*-Transheterozygote haben einen starken morphologischen Phänotyp, was sich vor allem in einer Störung der Keimstreifenausstreckung zeigt. Die Verminderung der Repression von *even-skipped* durch Knirps dagegen ist nur vorübergehend und nicht vollständig. Die *even-skipped*-Streifen 4-6 sind in Prä-Gastrula-Stadien der Mutanten, in denen im Wildtyp alle *even-skipped*-Streifen vollständig und mit klaren Grenzen erscheinen, unscharf und verwischt (Nibu et al., 1998b). Dennoch sind Streifen meist noch erkennbar.

*dCtBP/snail*-Transheterozygote weisen nur schwache mutante Phänotypen auf. Nur mit dem stärkeren *dCtBP*-Allel in trans zu der Defizienz *Df(3R)ry<sup>615</sup>*, die *snail* einschließt, lassen sich leichte Störungen der Ventralfurchenbildung beobachten. Diese sind sehr gering und von dem Phänotyp, der in *snail*-Heterozygoten gefunden wird, nicht unterscheidbar. Es liegt somit keine Versträrkung des *sna/+* -Phänotyps vor. Die Invagination des Mesoderms findet in allen Fällen und allen untersuchten Embryonen statt. Wird die Expression der Zielgene von *snail* in dieser genetischen Situation untersucht, zeigt sich, daß bei *dCtBP/snail*-Transheterozygoten, in denen das P-Element-induzierte *dCtBP*-Allel *dCtBP<sup>03463</sup>* verwendet wurde, keine stärkere Derepression im Vergleich zu *snail*-Heterozygoten beobachtet werden kann. Verwendet man das Allel *dCtBP<sup>rev19</sup>* oder *Df(3R)ry<sup>615</sup>*, führt dies zu einer etwas stärkeren Derepression von *snail*-Zielgenen, dies zeigt sich beispielweise deutlich bei der Derepression von *rhomboid* (Abb. 2.23). Sie zeigt sich darüber hinaus auch in der zusätzlichen Derepression von

*single minded* in den Transheterozygoten. Vermutlich kommt es auch zu einer leichten Derepression von *stardust*, dies konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Embryonen von *dCtBP*-Heterozygoten Müttern untersucht, in denen nur die Dosis von dCtBP reduziert ist. In keinem einzigen Fall konnte eine Derepression von Zielgenen von *snail* festgestellt werden.

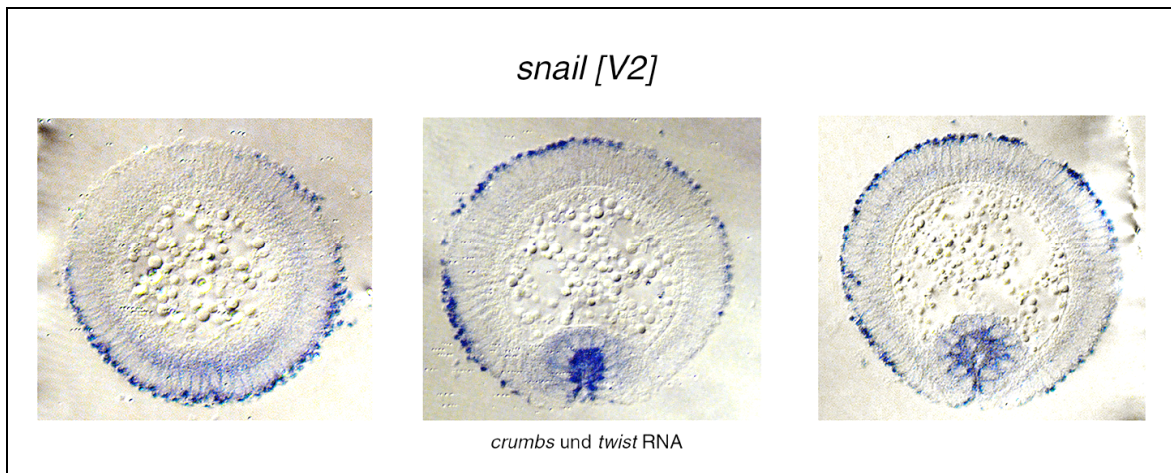
Die in situ-Hybridisierungs-Ergebnisse der *dCtBP<sup>rev19</sup>/snail*-Transheterozygoten sind in Tab. 2 detailliert aufgeführt. Ein Beispiel für Derepression in *dCtBP/snail*-Transheterozygoten ist in Abb. 2.23 gezeigt.



**Abb. 2.23:** Derepression von rhomboid in Embryonen die transheterozygot für *snail* und dCtBP sind. Das Mesoderm Embryonen dieses Genotyps invaginiert nahezu problemlos, die Expression von rhomboid im Mesoderm hält die gesamte Keimstreifaustreckung über an. Dieser Effekt ist stärker als bei *snail*-Heterozygoten oder Transheterozygoten, bei denen das Allel *CtBP<sup>03463</sup>* benutzt wurde.

## C Das Allel *snail*<sup>V2</sup>

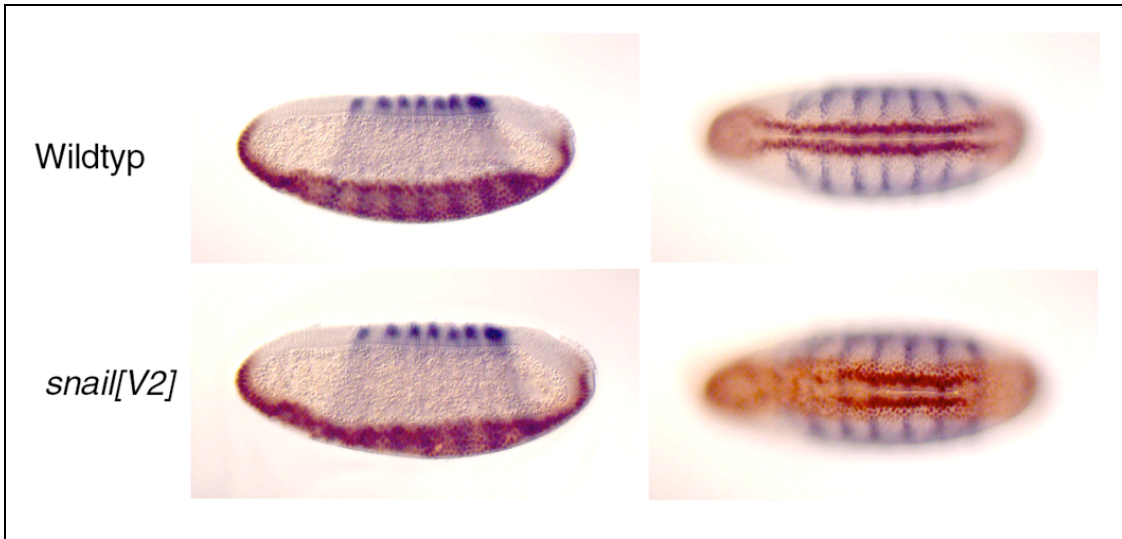
Das hypomorphe *snail*-Allel V2 weist, wie bereits publiziert wurde, besondere Eigenschaften auf (Hemavathy et al., 1997). Es wurde beschrieben, daß zwei Zielgene von *snail*, nämlich *single minded* und *rhomboid*, in homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen nicht mehr reprimiert werden. Andererseits invaginiert das Mesoderm vollständig. Eine Extrapolation der publizierten Ergebnisse (und die Diskussion in der Veröffentlichung) legt den Schluß nahe, daß eine Repression seiner Zielgene durch Snail nicht unbedingt notwendig ist. Da nur einige der *snail*-Zielgene in der publizierten Arbeit untersucht wurden, und die Morphogenese der *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen unvollständig dokumentiert war, beschloß ich, dieses *snail*-Allel genauer zu studieren.



**Abb. 2.24:** Derepression von *crumbs* in Embryonen, die homozygot für *sna*<sup>V2</sup> sind. Die Embryonen wurden zusätzlich mit einer Sonde gegen *twist* gefärbt, um auch in frühen Stadien die ventrale Seite bestimmen zu können.

Es wurden homozygot mutante Embryonen gesammelt und sowohl die Morphologie der Embryonen als auch die Expression von 13 Zielgenen von *snail* untersucht. Die Expressionsdaten der *snail*-Zielgene sind in Tab. 2 dargestellt. Es zeigt sich, daß - neben den bereits publizierten - weitere Zielgene von *snail* im Bereich der Mesodermanlage der *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen nicht mehr reprimiert werden. Dazu gehören *short gastrulation* und *crumbs*. Die Derepression von *crumbs* in homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen ist in Abb. 2.24 in Querschnitten gezeigt. Sechs der untersuchten *snail*-

Zielgene sind in homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen dereprimiert. Im Fall von *stardust* konnte wegen der starken maternalen Expression und weil die Derepression möglicherweise nur schwach ausfällt, kein eindeutiges Urteil gefällt werden. Aber es kann insgesamt festgestellt werden, daß, obwohl mindestens sechs der *snail*-Zielgene dereprimiert sind, das Mesoderm in das Innere des Embryos invaginiert.



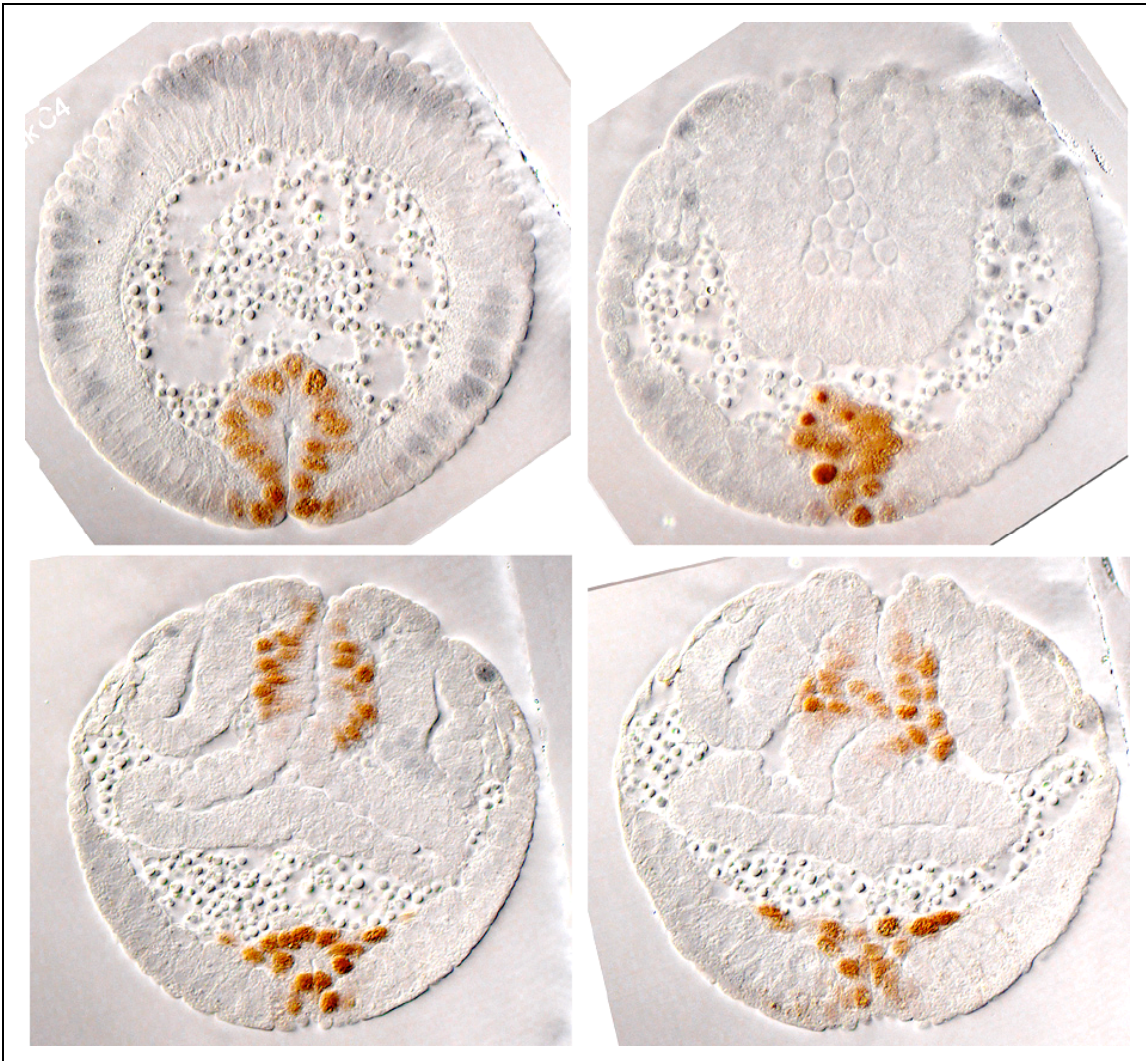
**Abb. 2.25:** In Embryonen, die homozygot für *snail*<sup>V2</sup> sind, invaginiert das Mesoderm verzögert und ungleichmäßig. Die Embryonen wurden gefärbt gegen Twist und Even-skipped.

Die nächste Frage war: Wie sieht die Ventralfurchenbildung in homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen aus? Entspricht sie der von Wildtyp-Embryonen? Mutante Embryonen wurden mit Doppel-Antikörperfärbungen gegen Twist und Even-skipped markiert. Anschließend wurden Embryonen und Querschnitte von Embryonen ausgewertet. Beim Vergleich der *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen mit Wildtyp-Embryonen (Abb. 2.25) zeigt sich, daß zwar eine Invagination des Mesoderms erfolgt, aber diese geschieht mit einer deutlichen Verzögerung. Zu einem Zeitpunkt, in dem in Wildtyp-Embryonen das Mesoderm bereits komplett invaginiert und die Ventralfurche bereits vollständig geschlossen ist, läßt sich in *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums feststellen, daß die Ventralfurchenbildung unvollständig, ungleichmäßig und verspätet erfolgt. In Querschnitten späterer Stadien von homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen zeigt



sich außerdem, daß die Ausbreitung des Mesoderms auf dem darunterliegenden Ektoderm gestört ist (Abb. 2.26). Das Mesoderm invaginiert verspätet und die nachfolgenden Prozesse erscheinen ebenfalls verzögert. Zu einem Zeitpunkt, wenn in Wildtyp-Embryonen bereits die Ausbreitung des Mesoderms begonnen hat, kann man in *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen feststellen, daß die Invagination des Mesoderms noch nicht abgeschlossen ist. Dadurch scheint auch die Umwandlung des Mesoderms vom Epithel in ein Mesenchym verzögert zu sein.

In *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen findet also - trotz Derepression von *snail*-Zielgenen - zwar die Invagination der Mesodermanlage und auch die Ausbreitung des Mesoderms auf dem darunterliegenden Ektoderm statt, aber beide Prozesse sind im Vergleich zu Wildtypembryonen deutlich gestört.



**Abb. 2.26:** Morphologische Defekte bei *snailV<sup>2</sup>*. In Embryonen, die homozygot für *snailV<sup>2</sup>* sind, invaginiert das Mesoderm mit einer deutlichen Verzögerung. Dies wird deutlich, wenn man sich beispielsweise den Embryo oben rechts ansieht. Dort teilen sich die Zellen bereits, obwohl sie noch nicht vollständig das Innere des Embryos erreicht haben.

**Tab. 2: Repression und Derepression von Zielgenen von *snail* in verschiedenen genetischen Situationen**

|                        | <b>l'sc</b> | <b>dl</b> | <b>sc</b> | <b>ac</b> | <b>PSI</b> | <b>brk</b> | <b>shg</b> | <b>sdt</b> | <b>crb</b> | <b>sim</b> | <b>rho</b> | <b>vnd</b> | <b>sog</b> | Mutanter Gastrulationsphänotyp ?                  |
|------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|
| wt                     | -           | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | nein  |
| CtBP/+<br>1)           | -           | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | nein  |
| sna/+<br>2)            | -           | -         | -         | -         | -          | -          | ?          | -          | -          | -          | +          | +          | +          | schwacher Ventralfurchen-Defekt, danach normal    |
| sna/+;<br>CtBP/+<br>3) | -           | -         | -         | -         | -          | -          | ?          | ?          | -          | +          | +          | +          | +          | schwacher Ventralfurchen-Defekt, danach normal    |
| sna <sup>v2</sup>      | -           | -         | -         | -         | -          | -          | +          | ++?        | +          | +          | +          | +          | +          | Invaginat.verzögert, Mesoderm-ausbreitung gestört |
| sna<br>2)              | +           | +         | +         | +         | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | +          | Keine Invagination des Mesoderms                  |

+ : Gen ist exprimiert im Mesoderm = dereprimiert  
 - : Gen ist nicht exprimiert im Mesoderm = reprimiert

Zur Genetik der Experimente:

1) Embryonen von Müttern, die heterozygot für CtBP<sup>rev19</sup> sind

2) Verwendet wurde eine kleine Df: Df(2L)TE116GW11

3) Embryonen v. heterozygoten CtBP<sup>rev19</sup>-Müttern, die gegen heterozygote snail(-)-Väter gekreuzt wurden

Zusammenfassung der bisherigen Misexpressionsexperimente:

Betrachtet man die in Tab. 2 dargestellten Experimente insgesamt, dann lassen sich folgende Ergebnisse festhalten:

- 1) Es ist möglich, mit genetischen Methoden verschiedene Situationen herzustellen, in denen Zielgene von *snail* im Mesoderm dereprimiert sind.
- 2) Der Repressionsmechanismus, der die Expression ektodermaler Gene im Mesoderm verhindert, reagiert empfindlich auf eine Reduzierung der Aktivität von *snail*: Eine Halbierung der Gendosis von *snail* führt bereits zu einer Derepression von mindestens dreien seiner Zielgene.
- 3) Eine Halbierung der Gendosis des Co-Repressors von *snail*, dCtBP, hat bei den 13 untersuchten Zielgenen von *snail* keine Auswirkung auf deren Repression.
- 4) Gleichzeitige Reduzierung der Gendosis von *snail* und dCtBP verstärkt die Derepression nur leicht.
- 5) In allen untersuchten Situationen, in denen partielle Derepression von *snail*-Zielgenen beobachtet werden kann, findet die vollständige Invagination des Mesoderms statt.
- 6) In der Situation, in der die partielle Derepression am weitesten geht, in homozygoten *snail*<sup>V2</sup>-Embryonen, läßt sich sowohl eine vorübergehende Störung der Ventralfurchenbildung als auch eine Störung der Mesodermausbreitung nach dessen Invagination feststellen.
- 7) Vergleicht man das Verhalten der *snail*-Zielgene in den verschiedenen genetischen Situationen, so zeigt sich, daß diese unterschiedlich empfindlich auf eine Reduzierung der Repression reagieren. Gene wie *sog*, *rho* und *vnd* reagieren bereits auf geringe Reduzierung der *snail*-Aktivität, während Zielgene wie *lethal of scute* oder *Delta* nur dann im Bereich der Mesodermanlage exprimiert werden, wenn man die Aktivität von *snail* auf Null reduziert. Die Anordnung der verschiedenen *snail* Zielgene in Tab. 2 soll dieses Gefälle widerspiegeln: Sie sind von links nach rechts so angeordnet, daß jene, die sich von *snail* am effektivsten reprimieren lassen, links und jene, die auf eine Reduzierung der *snail*-Aktivität am empfindlichsten reagieren, rechts stehen. Dabei ist auffällig, daß in der linken Hälfte vor allem solche Gene stehen, die eine Rolle als neurogene oder proneurale Gene haben.



### 2.3.2.2 Überexpression von Zielgenen von *snail* mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems

Ein anderer Weg, Zielgene von *snail* ektopisch im Mesoderm exprimieren zu können, ist der Einsatz des UAS/Gal4-Systems (Brand and N., 1993). *Snail* kann die Aktivierung von Genen mit UAS-Sequenzen im Promoter durch das Gal4-Protein nicht reprimieren. Somit können Überexpressionsstudien in Anwesenheit von *Snail* durchgeführt werden.

Von mehreren der Zielgene von *snail* sind UAS-Konstrukte verfügbar. Mit diesen und mit Hilfe von Gal4-Konstrukten, die eine Expression des Aktivators Gal4 vor der Gastrulation erlauben, können *snail*-Zielgene zum Zeitpunkt der Ventralfurchenbildung im Mesoderm stark überexprimiert werden. Als Aktivator-Linien wurden dabei Gal4-Linien verwendet, die eine Expression von Gal4 bereits während der Oogenese ermöglichen. Gal4 ist dann in der Entwicklung über die Gastrulation hinaus ubiquitär im Embryo vorhanden. In Tabelle 3 findet sich eine Zusammenstellung solcher Experimente. Darin werden Experimente zusammengefaßt, die aus verschiedenen Quellen stammen:

- 1) Überexpressionsstudien, die bereits publiziert wurden:  
*lethal of scute, brinker* (Hemavathy et al., 1997; Jazwinska et al., 1999b).
- 2) Überexpressionsstudien, die von M. Narasimha durchgeführt wurden (unveröffentlicht) *shotgun, PS1, crumbs*.
- 3) Überexpressionsstudien anderer Arbeitsgruppen, die bisher nicht publiziert wurden:  
*stardust* (Andre Bachmann, Labor von E. Knust, Düsseldorf, persönliche Mitteilung).
- 4) Überexpressionsstudien, die von mir selbst durchgeführt wurden.  
*Delta, short gastrulation*.

Die Ergebnisse aller aufgelisteten Überexpressionsexperimente lassen sich in einen Satz fassen:

In keinem der Fälle konnte eine Störung der Ventralfurchenbildung oder sogar ein völliges Ausbleiben der Invagination des Mesoderms beobachtet werden.

Somit ließ sich für keines der untersuchten Gene feststellen, daß dessen alleinige Repression ein zwingendes Erfordernis für die Invagination der Ventralfurche darstellt.

**Tabelle 3: Überexpression von Zielgenen von *snail* während der Gastrulation**

|           | <b>l'sc</b> | <b>dl</b>  | <b>sc</b> | <b>ac</b> | <b>PSI</b> | <b>brk</b> | <b>shg</b> | <b>sdt</b> | <b>crb</b> | <b>sim</b> | <b>rho</b> | <b>vnd</b> | <b>sog</b> |
|-----------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| UAS<br>*) | - <b>a</b>  | - <b>d</b> | nd        | nd        | - <b>b</b> | nd         | - <b>b</b> | - <b>c</b> | - <b>b</b> | nd         | nd         | nd         | - <b>d</b> |

- + : es treten Morphogenetische Defekte auf  
 - : es treten keine morphogenetischen Defekte auf

\*) : Überexpressionsexperimente, in denen Väter von UAS-Effektorlinien der betreffenden Gene mit Müttern von Gal4-Linien gekreuzt wurden, in denen Gal4 bereits während der Oogenese exprimiert wird ("maternale Gal4-Linien"); dadurch ist Überexpression bereits in frühen Embryonalstadien möglich

Quellen der Überexpressionsexperimente:

- a: K. Hemavathy et al., Dev., 124 3683 f., 1997  
 b: M. Narasimha, unveröffentlicht  
 c: André Bachmann, unveröffentlicht  
 d: T. Seher (verwendete Fliegenstämme s. Mat. u. Methoden)

### 2.3.3 Indizien für eine erweiterte Rolle von *snail*:

#### **Snail als möglicher Aktivator von Transkription im Mesoderm**

Bei allen bisherigen Überlegungen und Experimenten bezüglich der Rolle von *snail* stand dessen Funktion als Repressor von Genexpression im Blickpunkt. Das Testsystem hierfür war die in situ-Hybridisierung an Embryonen. Der Verlust der Aktivität von *snail* zeigte sich dabei stets in der Ausweitung der Expressionsdomänen von *snail*-Zielgenen in die Mesodermanlage hinein.

In einigen Arbeiten war berichtet worden, daß es auch Gene gibt, die genau das entgegengesetzte Expressionsverhalten zeigen, wenn die Aktivität von *snail* ausgeschaltet wird: In Wildtypembryonen sind diese Gene im Bereich der Mesodermanlage exprimiert. Bei Wegfall der *snail*-Aktivität reduziert sich im Mesoderm die Expression dieser Gene oder verschwindet völlig. Die bisher publizierte Beispiele sind *folded gastrulation*, *zfh-1*, *serpent* (Hemavathy et al., 1997; Lai et al., 1991; Morize et al., 1998; Reuter, 1994) und zwei mesodermspezifische Gene, *D'* und *G'* genannt, die im Verlauf einer subtraktiven Hybridisierung isoliert wurden (Casal and Leptin, 1996). Beispiele für dieses Expressionsverhalten sind in Abb. 2.27 und 2.28 zu sehen.

Ich untersuchte durch in situ-Hybridisierungsexperimente, ob es weitere mesodermal exprimierte Gene gibt, für die charakteristisch ist, daß ihre Expression in *snail*-Mutanten im Bereich der Mesodermanlage abnimmt oder ganz verschwindet. Dazu wurden Embryonen, die homozygot für eine Nullmutation von *snail* waren, mit Dig-markierten RNA-Sonden hybridisiert.

Es konnte für zwei weitere Gene gezeigt werden, daß ihre Expression in *snail*-Mutanten abnimmt: *folded gastrulation* und *PS2* (Synonym: *inflated*). Andere Experimente legen nahe, daß dies möglicherweise auch für *tribbles* oder *frühstart* gilt (s. Kapitel 2.4). Es gibt somit mindestens sieben Gene, für deren volle Expression im Mesoderm *snail* notwendig ist. Es besteht also die Möglichkeit, daß *snail* nicht nur als Repressor sondern auch als direkter Aktivator von Transkription agiert. Es ist genauso möglich, daß es sich um einen indirekten Effekt handelt: Die Expression ektodermaler

Gene in der Mesodermanlage könnte dazu führen, daß mesodermspezifische Transkriptionsfaktoren inhibiert werden, wodurch eine normale Aktivierung der untersuchten Gene gestört wird.

| Name                       | Rolle in der Entwicklung  | Protein   | Referenz  |
|----------------------------|---|---|---|
| <i>serpent</i>             | Spezifiziert v. Endoderm, Entw. v. Mittel- und Hinterdarm           | TF, GATA-Klasse                                   | (Reuter, 1994)9]  |
| <i>zfh-1</i>               | somat. Muskulatur   | TF, Zinkfinger-Homeodomänen-Typ                   | (Lai et al., 1991)2]  |
| <i>#D</i>                  | ??  | ??  | (Casal and Leptin, 1996)0]  |
| <i>#G</i>                  | ??  | ??  | (Casal and Leptin, 1996)0]  |
| <i>folded gastrulation</i> | Ventralfurchenbildung, posteriore Mitteldarminvagination            | vermutl. sezernierter Ligand                      | (Costa et al., 1994; Morize et al., 1998)2]                                 |
| <i>PS2/inflated</i>        | Wanderung d. visceralen Mesoderms; Entw. d. somat. Muskulatur, etc. | alpha-Integrin-Unterein., Zell-Adhäsions-Rezeptor | (Brown, 1994; Wilcox et al., 1989)2]  |
| <i>tribbles ?</i>          | Zellteilungskontrolle während der Gastrulation<br>Proteinabbau?     | Se/Thr-Kinase-ähnlich, vermutlich inaktiv         | (Großhans and Wieschaus, 2002; Mata et al., 2000; Seher and Leptin, 2000)3] |
| <i>frühstart ?</i>         | Zellteilungskontrolle während der Gastrulation                      | keine Homologien                                  | J. Großhans, EDRC2001, unveröffentl.,                                       |

**Tabelle 4:**

**Gene, deren Expression im Mesoderm die Aktivität von *snail* benötigt**

Abgesehen von *fog* ist für keines der Gene, deren Expression im Mesoderm die Aktivität von *snail* zu benötigen scheint, bisher eine Funktion bei der Mesodermmorphogenese nachgewiesen worden.

Wie *snail* seine Aktivität auf diese Gene ausübt, kann mit den bisherigen Experimenten nicht beurteilt werden. Unabhängig davon, ob die Wirkung direkt oder indirekt ausgeübt wird, zeigt sich jedoch, daß die Aktivität von *snail* nicht nur für die Repression, sondern auch für die Aktivierung von Genexpression notwendig ist.

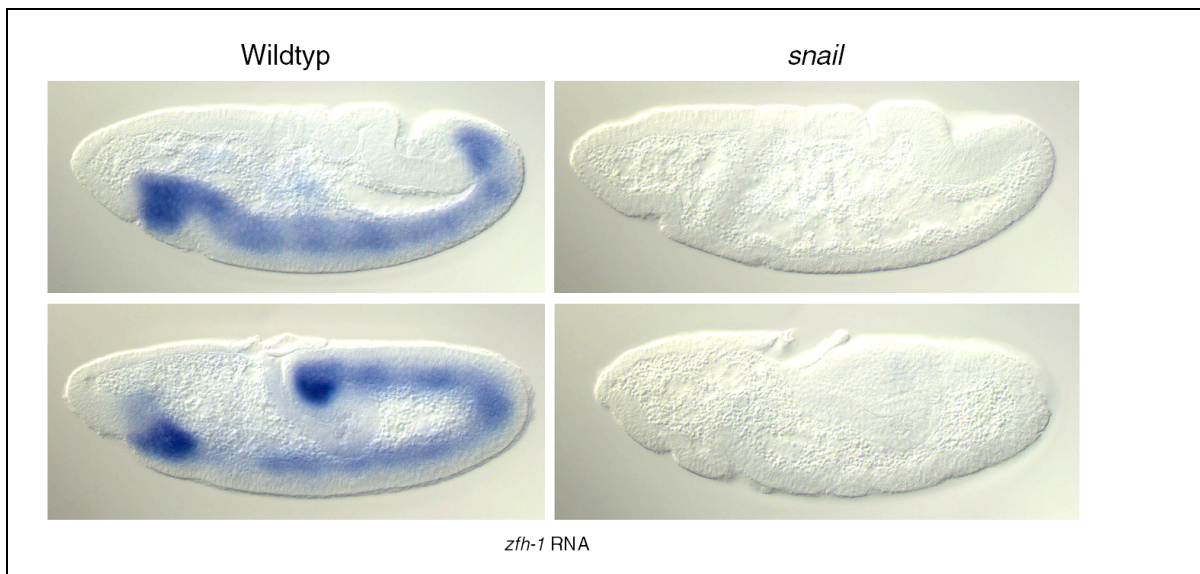


Abb. 2.27: Keine Expression von *zfh-1* in *snail*-Nullmutanten.

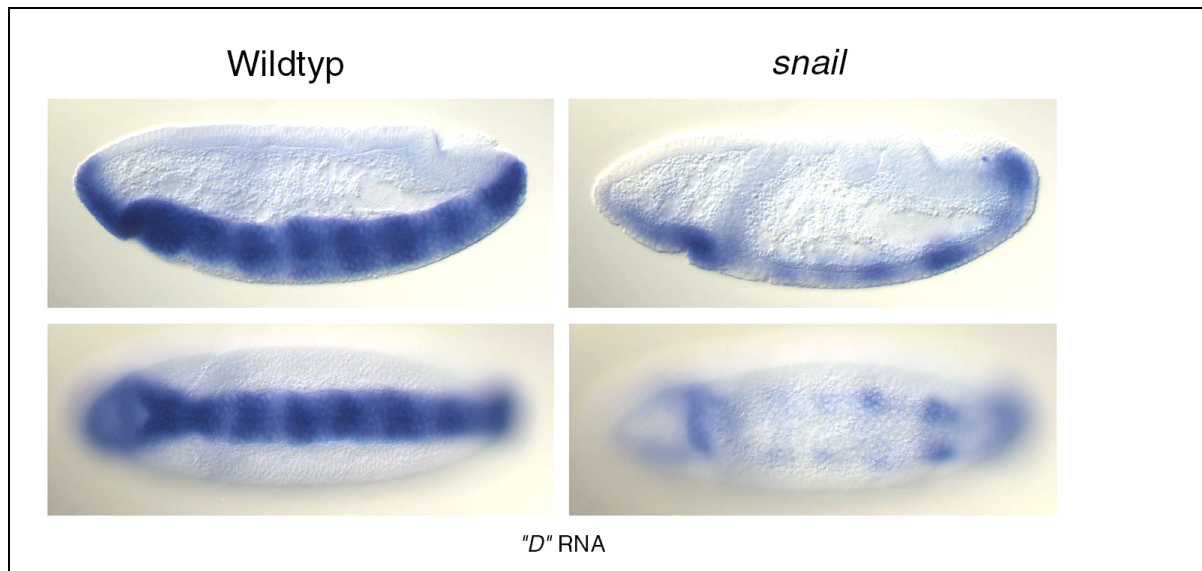


Abb. 2.28: Stark reduzierte Expression des Gens „*D*“ (s.Text) in *snail*-Nullmutanten.

## **2.4. Die Koordination von Morphogenese und Zellproliferation:**

### **Untersuchungen zur Kontrolle der Zellteilungen im mesodermalen Primordium während der Ventralfurchenbildung**

#### **2.4.1 Untersuchung der Phänotypen der Deletionen *Df(3L)BK10* und *Df(3L)ri79c* bzw. *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>*:**

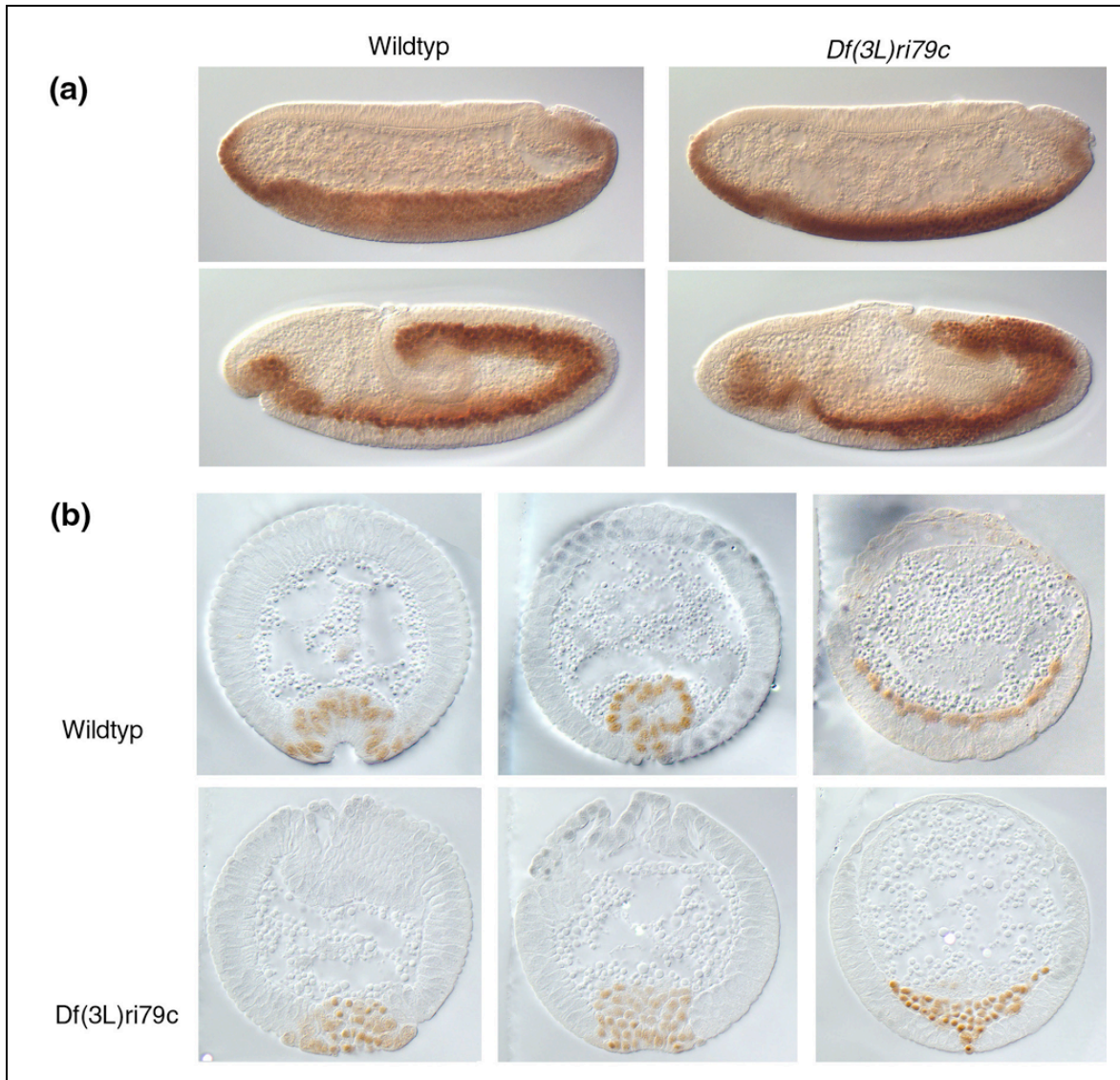
##### **Die Zellen des Mesodermprimordiums gehen vorzeitig in Mitose**

In dem in Kapitel 2.1 beschriebenen Defizienzen-Screen wurden vier Regionen als notwendig für eine normale Ventralfurchenbildung identifiziert. Embryonen, die homozygot mutant für eine dieser Deletionen sind, zeigen eine gestörte Ventralfurchenbildung. Eine der Regionen wird durch zwei überlappende Defizienzen repräsentiert. Embryonen, die homozygot für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind, zeigen eine starke, vorübergehende Störung der Invagination des Mesoderms. Das gleiche gilt für Embryonen, die transheterozygot für *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind. Daher wurde vermutet, daß der Locus, dessen Deletion für den Phänotyp verantwortlich ist, in den überlappenden Bereich der beiden Defizienzen kartiert.

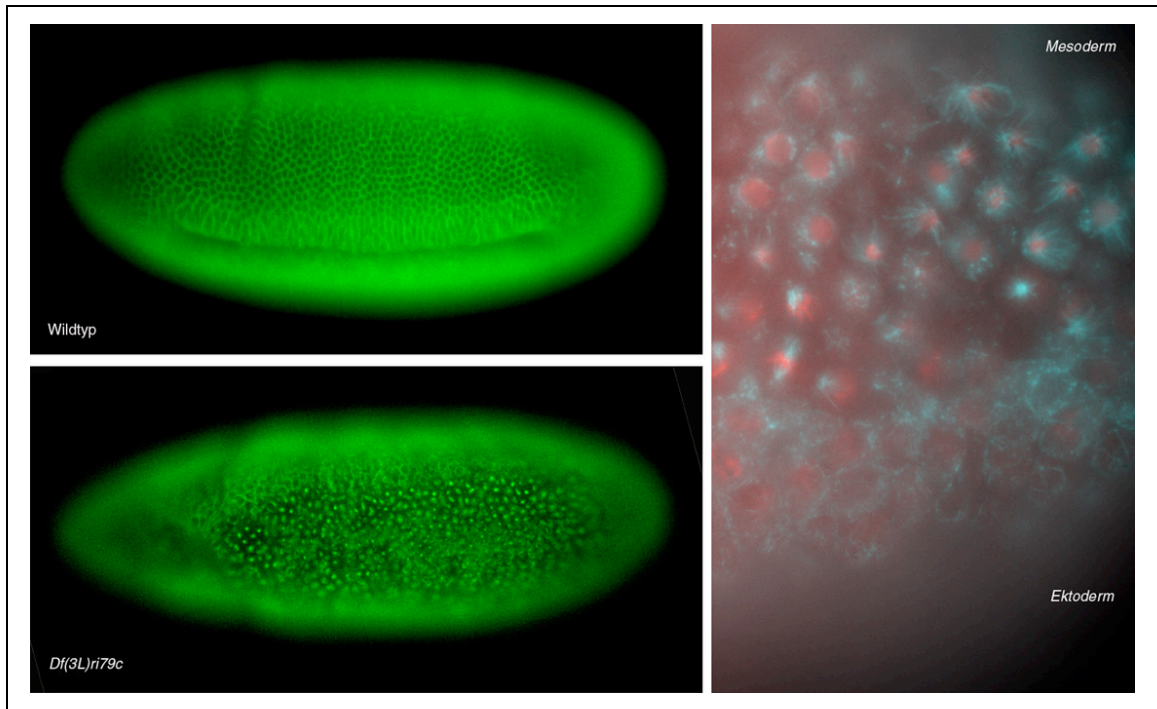
Ein Aspekt des Phänotyps dieser Mutanten ist, daß die mesodermalen Zellen nicht die gewohnte Abfolge von Zellformänderungen zeigen, wie es in Wildtyp-Embryonen der Fall ist. Viele Zellen erscheinen abgerundet, während sie noch auf der Außenseite des Embryos liegen. Bei genauerer Untersuchung des Phänotyps in mutanten Embryonen, die mit Antikörpern gegen Twist gefärbt wurden, zeigte sich eine weitere Auffälligkeit. Da Twist ein Kernprotein ist, färben Markierungen gegen Twist die Kerne der mesodermalen Zellen an. Während der Gastrulation in Wildtyp-Embryonen füllen die Kerne der mesodermalen Zellen in der Ebene senkrecht zur basal-apikalen Achse fast den gesamten Raum der Zelle aus. Dies gilt für die gesamte Invaginationsphase. In den untersuchten Mutanten jedoch zeigten viele der Kerne eine für diese Entwicklungsphase atypische Morphologie. Die Kerne erschienen klein und kondensiert, was sich auch in einer dunkleren Twist-Färbung zeigte, und hatten eine abgerundete Form. Diese Kernmorphologie ist in mesodermalen Zellen von Wildtypembryonen normalerweise erst



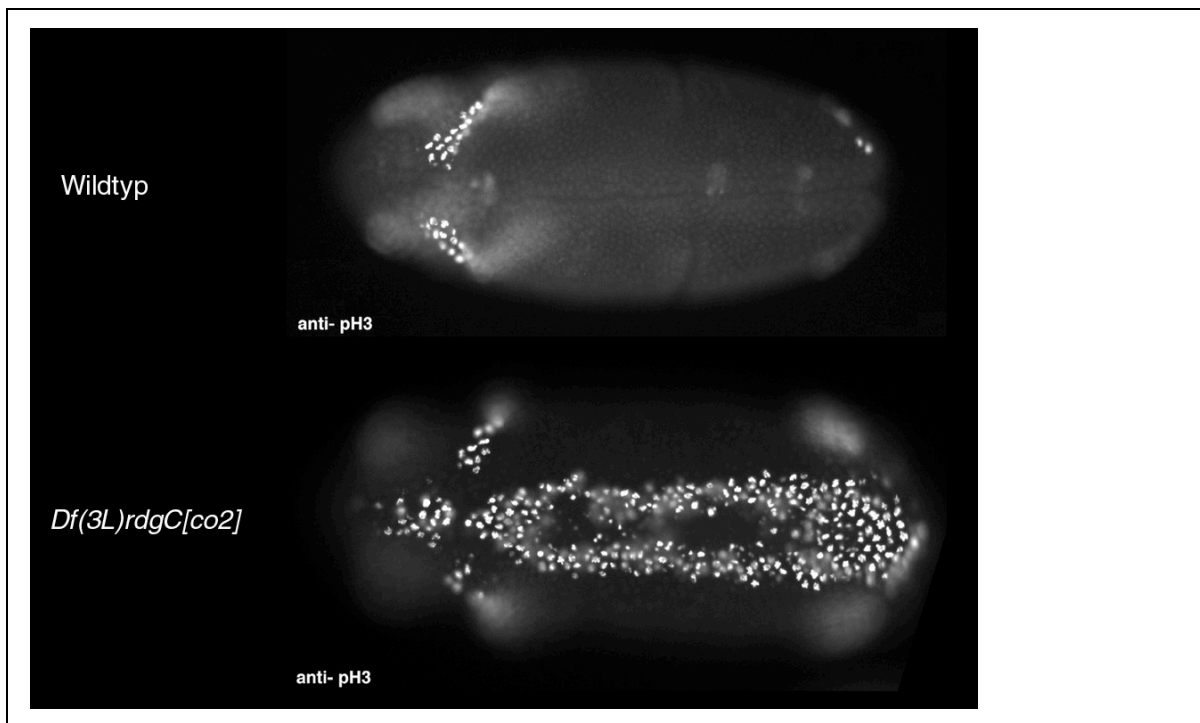
dann zu beobachten, wenn die Invagination abgeschlossen ist und die Zellen sich teilen. Die mesodermalen Zellen in den Mutanten erinnerten also an mitotische Zellen. In Embryonen, die homozygot für eine der beiden Defizienzen sind, sehen viele Zellen des Mesoderms so aus, als würden sie sich zu einem verfrühten Zeitpunkt und sogar noch außerhalb des Embryos teilen. Wenn das so wäre, würde die Teilung der mesodermalen Zellen etwa 30 Minuten früher stattfinden als normalerweise in Wildtyp-Embryonen zu beobachten ist (Foe, 1989).



**Abb. 2.29:** Die morphogenetischen Defekte, die in *Df(3L)ri79c* gefunden werden. Man beachte die Zellmorphologie in den Querschnitten der Mutanten.

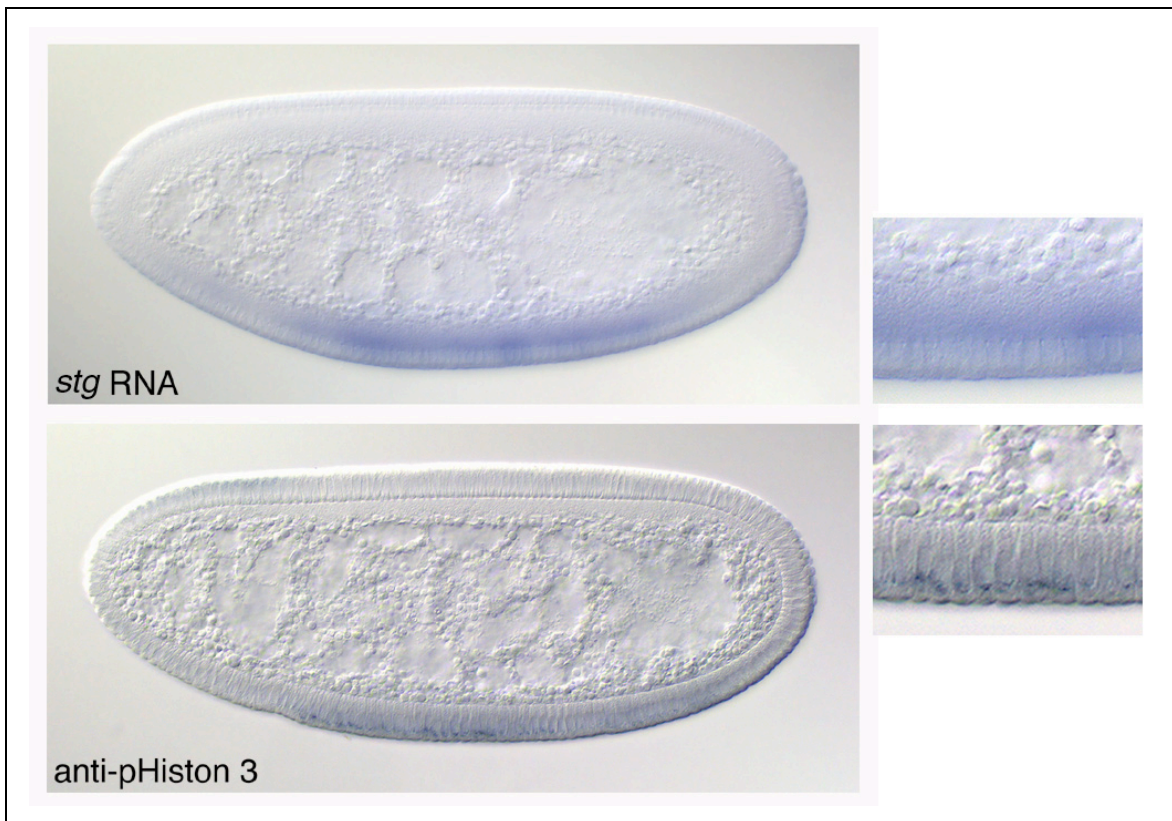


**Abb. 2.30:** Die Zellen des Mesoderms gehen in *Df(3L)ri79c* zu früh in Teilung. Embryonen gefärbt mit beta-Tubulin (links) oder zusätzlich mit Hoechst (DNA).



**Abb. 2.31:** Anti- PH3-Färbung zeigt, daß die Domänen MD10 und MD8 zu früh in Teilung gehen in *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>*.

Um zu analysieren, ob es sich bei den auffälligen mesodermalen Zellen um mitotische Zellen handelte, wurden Embryonen der beiden Stämme mit Antikörpern gegen die Proteine gamma-Tubulin und die phosphorylierte Form des Histons H3 (PH3) gefärbt. Mit Antikörpern gegen gamma-Tubulin lassen sich die mitotischen Spindeln anfärben. Die Phosphorylierung von H3 ist einer der Vorgänge, die die Mitose einleiten (Shibata et al., 1990) und kann mit anti-PH3 spezifisch nachgewiesen werden. Bei Embryonen, die homozygot entweder für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* oder transheterozygot für diese Deletionen sind, konnte mit beiden Färbungen nachgewiesen werden, daß sich die Zellen des Mesoderms tatsächlich teilten (Abb. 2.30 und 2.31). Im Gegensatz zur Situation in Wildtyp-Embryonen ist das Mesoderm in den Mutanten die erste Domäne, deren Zellen sich teilen (Abb. 2.32).



**Abb. 2.32:** Das Mesoderm ist die erste Domäne, die sich teilt in den Mutanten und folgt damit der Kinetik der *string* RNA-expression.

Die Analyse der Färbungen ergab, daß sich die mesodermalen Zellen nach und nach teilen, was auch in Querschnitten von Mutanten deutlich wird, die gegen Twist gefärbt wurden (Abb. 2.29). Die abnorme Kern- und Zellmorphologie, die dort beobachtet werden kann, betrifft immer nur einen Teil der Zellen. Schaut man sich in ganzen Embryonen frühere Stadien der Mutanten von ventral an, dann stellt man fest, daß sich zuerst die zentralen Zellen der Mesodermanlage teilen, daß heißt die am weitesten ventral und median gelegenen (Abb. 2.31). Erst danach gehen auch die mehr lateral und mehr anterior und posterior gelegenen Zellen in Teilung. Der früheste Zeitpunkt, zu dem mitotische mesodermale Zellen in den Mutanten gefunden werden konnten, war das Ende der Zellularisierung, also in etwa der Zeitpunkt, wenn normalerweise die Ventralfurchenbildung einsetzt (Abb. 2.32).

Um zu klären, ob es sich um frühzeitige Teilungen des Mesoderms handelt oder um eine zusätzliche Teilung, wurden spätere Stadien der Mutanten untersucht, in denen das Mesoderm bereits größtenteils ins Innere des Embryos gelangt ist, also zu einem Zeitpunkt, wo sich die Zellen des Mesoderms normalerweise teilen würden (s. Kap. 2.2). Eine erneute Teilungswelle konnte nicht beobachtet werden. Zwar findet man mesodermale Zellen, die sich innerhalb des Embryos teilen, aber dies betrifft nur einen kleinen Teil der Zellpopulation. Es handelt sich dabei vermutlich um Zellen, die sich - während das Mesoderm ins Innere des Embryos gelangt - noch nicht geteilt hatten. In Querschnitten von Embryonen, die gegen Twist gefärbt waren, findet man Zellen, die nahezu normale Zellformänderungen durchlaufen und deren Kernmorphologie ebenfalls normal erscheint. Das bedeutet, daß sie sich noch nicht geteilt hatten. Ich vermute daher, daß diese Zellen den 14. Teilungszyklus innerhalb des Embryos vollenden. Die meisten Zellen teilen sich jedoch außerhalb des Embryos oder während der Passage ins Innere des Embryos. Es spricht somit vieles dafür, daß es sich bei den beobachteten Teilungen um verfrühte Teilungen handelt. Diese Annahme wird durch ein weiteres Argument gestützt: Würde es sich nicht um eine verfrühte, sondern um eine zusätzliche Teilung handeln, die von der eigentlichen 14. Zellteilung gefolgt würde, müßte man eine größere Anzahl von Zellen, und somit eine höhere Zelldichte im invaginierten Mesodem finden. Der Vergleich von Querschnitten von Wildtypen und Mutanten zeigte aber, daß dies nicht der Fall ist.

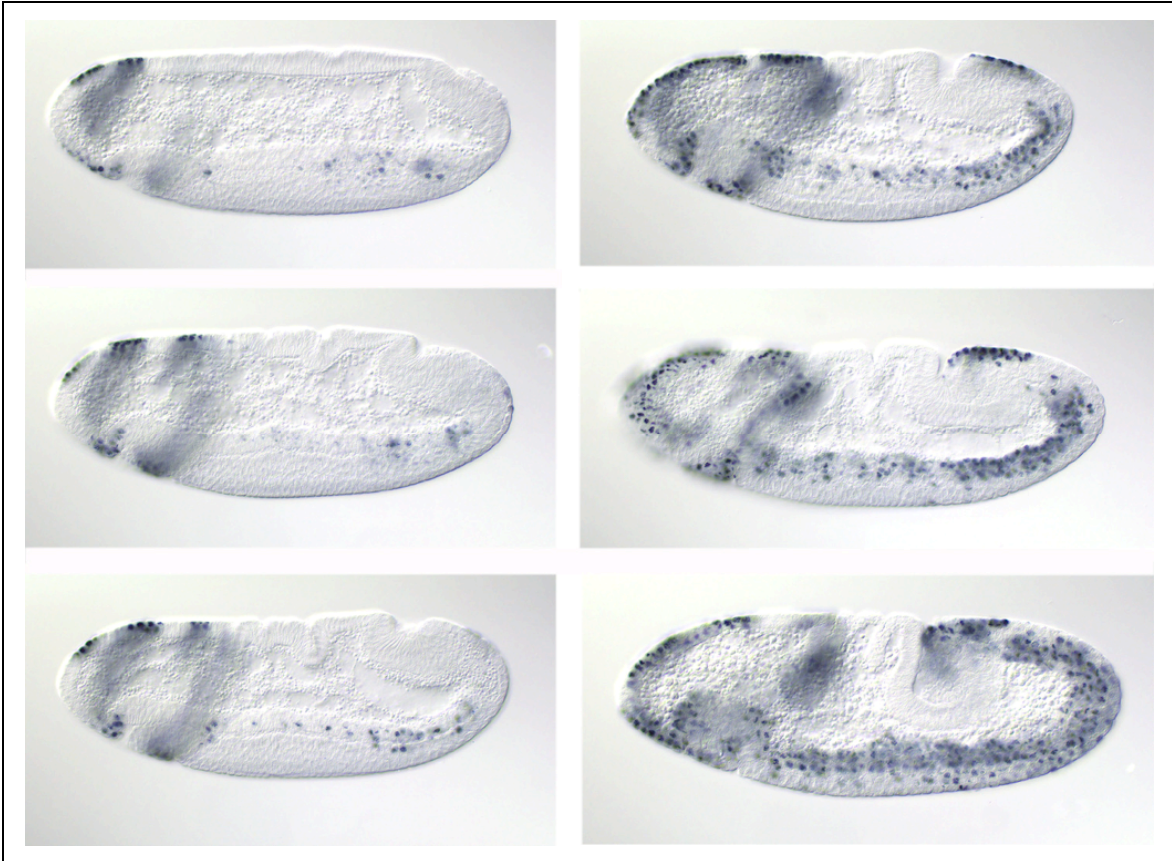


Eine weitere Möglichkeit bestand darin, daß es sich möglicherweise um stark verspätete Teilungen des Zellzyklus 13 handeln könnte (der normalerweise etwa 50 Minuten früher vollendet wurde, Foe, '89), und daß sich die mesodermalen Zellen bei dem beobachteten Phänotyp nicht nur einmal, sondern zweimal teilen, weil möglicherweise die 13. und 14. Teilung zeitlich nahe zusammengedrückt waren. Obwohl dies sehr ungewöhnlich wäre, wurden die Embryonen auch im Hinblick auf diese Annahme untersucht. Wäre obige Annahme der Fall, und die beobachteten frühen mesodermalen Teilungen wären verspätete Teilungen des 13. Teilungszyklus, dann müßten sich die Zellen des Mesoderms vor den Teilungen noch am Ende des 12. Teilungszyklus befunden haben. Die Mesodermanlage müßte dann aber vor Einsetzen der Zellteilungen aus 50% weniger Zellen bestehen als dies in Wildtypembryonen der Fall ist. Die Auswertung der Querschnitte zeigte aber klar, daß in den Mutanten die Anzahl der mesodermalen Zellen gegen Ende der Zellularisierung nicht geringer war als in Wildtypen des gleichen Stadiums. Daraus konnte auch geschlossen werden, daß die ersten 13 Teilungen, die unter maternaler Kontrolle stehen, in den Mutanten normal verlaufen waren. Auch Sammlungen von mutanten Embryonen, die deutlich jünger (0 bis 2 Stunden AED) waren als Embryonen zu Beginn der Gastrulation, zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten im Kernteilungsverhalten.

Es muß daher angenommen werden, daß es sich bei den Zellteilungen im Mesoderm von Embryonen, die homozygot für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdg<sup>co2</sup>* sind, um verfrühte Zellteilungen des Zellzyklus 14 in der mitotischen Domäne 10 (MD10=Mesoderm) handelt.

In Wildtyp-Embryonen teilt sich das Mesoderm genau genommen nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt oder in einer kurzen Phase, sondern über einen Zeitraum von rund 10 Minuten. Die ersten Teilungen können bereits während der Ventralfurchenbildung gefunden werden (Abb. 2.33). Allerdings betrifft dies immer nur wenige Zellen. Im Verlauf der Invagination nimmt die Zahl der sich teilenden Zellen dann kontinuierlich zu und erreicht das Maximum, nachdem das Mesoderm komplett invaginiert und die Ventralfurche geschlossen ist, und die Zellen des Mesoderms beginnen, einen mesenchymalen Charakter anzunehmen (Abb. 2.33). Vergleicht man die Kinetik der Teilungen der mesodermalen Zellen von Wildtyp- und mutanten Embryonen, dann zeigt

sich, daß in den Mutanten die Teilungen innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls ablaufen als beim Wildtyp. Die mesodermalen Zellen der Mutanten teilen sich also nicht nur früher als in Wildtypen, sie teilen sich insgesamt auch schneller.



**Abb. 2.33:** Die Teilungskinetik des Mesoderms im Wildtyp. Das Mesoderm teilt sich genau genommen über einen längeren Zeitraum.

*Sind verfrühte Zellteilungen in den Mutanten auf MD10 beschränkt?*

Nachdem gezeigt war, daß sich die Zellen des Mesoderms in den beschriebenen homozygoten und transheterozygoten Mutanten frühzeitig teilten, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt mesodermspezifisch ist. Eine genauere Untersuchung der frühen und weiterer Stadien der Embryonalentwicklung wurde durchgeführt. Dazu wurden die Embryonen erneut mit anti-PH3 Antikörper gefärbt. Es wurde eine weitere mitotische Domäne identifiziert, die sich in den Mutanten frühzeitig teilt. Es handelt sich dabei um

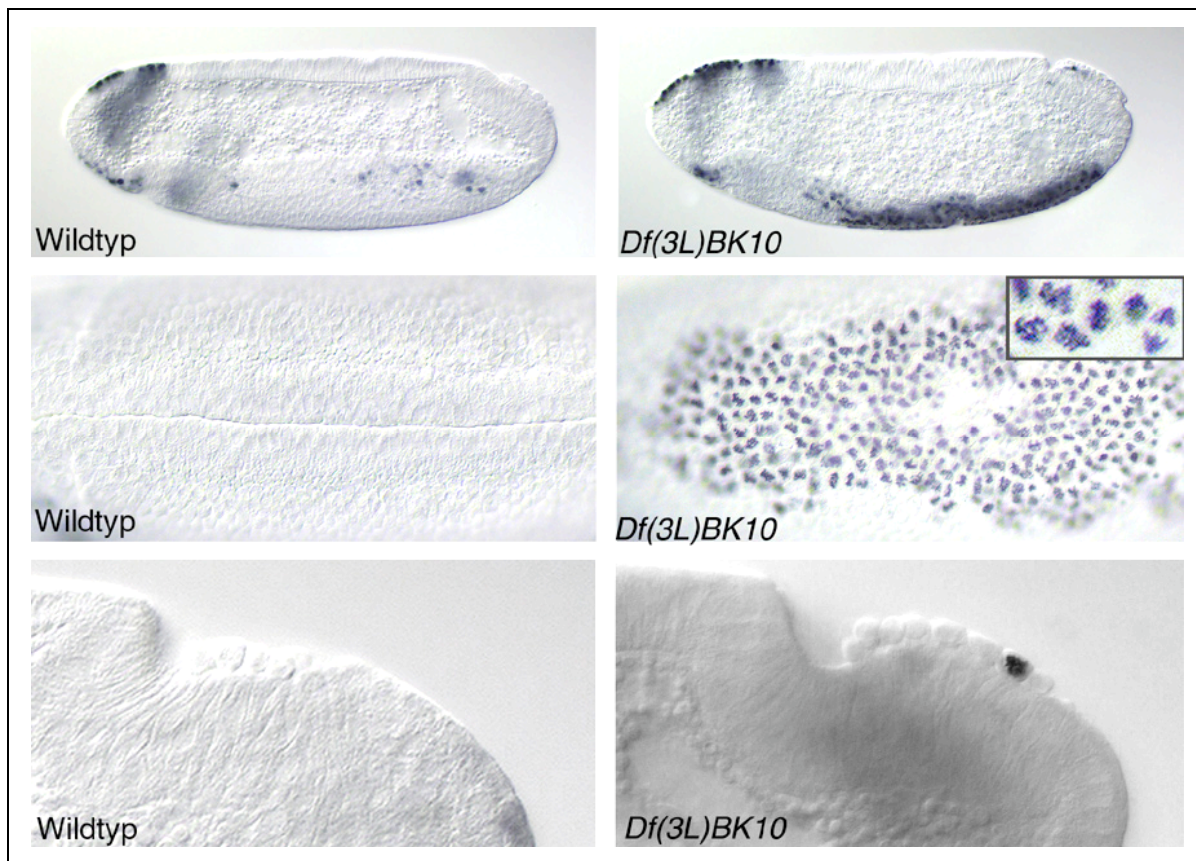
MD8 (s.Abb. 2.31). Diese liegt am anterioren Ende des Embryos auf der ventralen Seite. MD8 teilt sich in Wildtyp-Embryonen kurz vor dem Mesoderm (Foe, 1989). In den Mutanten hingegen teilt sich MD8 praktisch zeitgleich mit MD10. Die einzige andere Domäne, die in manchen Embryonen atypisch erschien, war MD3. Sie erschien in einigen Färbungen nach anterior hin vergrößert. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in allen mutanten Embryonen nachgewiesen werden. Der Zeitpunkt der Teilung in MD3 erschien in den Mutanten auch dann, wenn die Ausdehnung der Domäne größer als üblich war, normal zu sein. Eine verfrühte Zellteilung wurde nie festgestellt. In den anderen mitotischen Domänen konnte kein offensichtlicher Teilungsdefekt nachgewiesen werden.

Es wurde eine weitere Gruppe von Zellen identifiziert, die in Embryonen, die homozygot defizient für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind, abnormales Teilungsverhalten zeigen. Dabei handelt es sich um die Polzellen. Diese werden keiner mitotischen Domäne zugeordnet, weil sich die Polzellen in der Phase, wo die mitotischen Domänen zu sehen sind, normalerweise nie teilen (Foe, 1989). Nach der Knospung der Polzellen im Stadium des syncytialen Blastoderms teilen sich diese noch zweimal. Dies ist deutlich vor Ende der Zellularisierung abgeschlossen. Normalerweise teilen die Polzellen sich dann für den Rest der Embryonalentwicklung nicht mehr. Erst im Larvenstadium können wieder Teilungen der Polzellen beobachtet werden (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). In etwa 75% der untersuchten Mutanten hingegen wurden vereinzelte Teilungen der Polzellen gefunden. Es waren meist nur wenige (eine oder zwei) Polzellen, die sich zur gleichen Zeit teilten. Es wurde niemals beobachtet, daß sich alle Polzellen teilen. Aus der Analyse der Färbungen ergab sich außerdem, daß es sich auch nicht um sukzessive Teilungen der gesamten Polzellpopulation, sondern um vereinzelte Teilungen handelte.

*Sind in den anderen als notwendig für eine normale Ventralfurchenbildung identifizierten Regionen möglicherweise auch Loci enthalten, die eine Rolle bei der Kontrolle der Zellteilungen des Mesodermprimordiums spielen?*

Um diese Frage zu beantworten, wurden mutante Embryonen, die homozygot defizient für *Df(2R)ed dp*, *Df(3L)BK10* oder *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* sind, mit Antikörpern gegen PH3 gefärbt. Die Auswertung der Färbungen ergab, daß in Embryonen, die homozygot defizient für *Df(3L)BK10* sind, die Zellen des Mesoderms ebenfalls vorzeitig in Teilung gehen. Auch die anderen Aspekte, die bereits in Embryonen, die homozygot für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind, beobachtet wurden, nämlich, daß auch MD8 vorzeitige Teilungen zeigt, und daß es zu vereinzelt Teilungen der Polzellen kommt, konnten in Embryonen homozygot defizient für *Df(3L)BK10* beobachtet werden. Der mutante Phänotyp gleicht dem der anderen Mutanten nahezu völlig.

Bei den beiden anderen Deletionen, *Df(2R)ed dp* und *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* wurden keine Abänderungen des normalen Teilungsmusters festgestellt.



**Abb. 2.34:** *Df(3L)BK10* zeigt den gleichen Phänotyp wie *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC*. Auch der Polzellphänotyp wird beobachtet. Alle Färbungen: anti-PH3.



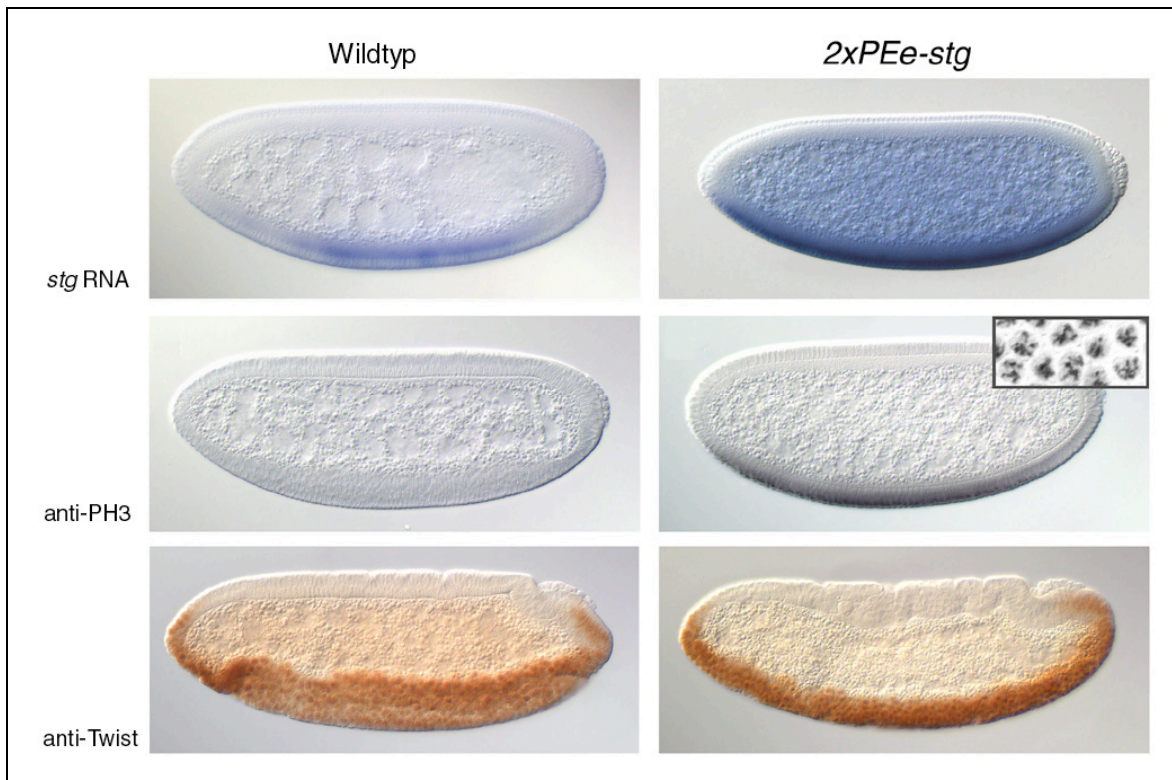
*Besteht funktionelle Redundanz zwischen den durch  $Df(3L)BK10$  bzw.  $Df(3L)ri79c$  und  $Df(3L)rdgC^{co2}$  aufgedeckten Lokussen im Hinblick auf den Zellzyklusphänotyp?*

Wäre dies der Fall, dann müßte die gleichzeitige Deletion beider Loci zu einem stärkeren Zellzyklusphänotyp führen. In Kap. 2.1 war schon gezeigt worden, daß im Hinblick auf den Gastrulationsphänotyp keine Verstärkung festzustellen war. Doppelt-defiziente Embryonen, die homozygot sowohl für  $Df(3L)BK10$  als auch für  $Df(3L)ri79c$  sind (rekombinante Chromosomen, s. Kap. 2.1), wurden mit anti-PH3 gefärbt und analysiert. Es konnte kein stärkerer Zellzyklusphänotyp festgestellt werden. Es wurden wie bei den einfach defizienten Mutanten frühzeitige Teilungen der Zellen in MD8 und MD10, sowie Teilungen der Polzellen während der Gastrulation nachgewiesen werden. Die Teilungen in MD8 und MD10 setzten zu Beginn der Gastrulation ein. Andere mitotische Domänen zeigten auch hier keine offensichtliche Abweichung vom normalen Teilungsmuster.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise eine genetische Interaktion bei der Kontrolle von Zellteilungen zwischen den Lokussen in  $Df(3L)BK10$  und  $Df(3L)ri79c$  einerseits und  $Df(2R)ed dp$  oder  $Df(3R)Tl^P$  andererseits besteht, wurden auch die anderen Doppeldefizienzen im Hinblick auf das Zellteilungsmuster von Zellzyklus 14 untersucht. Doppelt-defiziente Embryonen aller möglichen Kombinationen (s. Kap. 2.1) wurden mit anti-PH3 gefärbt und analysiert. Doppelt-defiziente Embryonen, wo eine der beiden Defizienzen  $Df(3L)BK10$  oder  $Df(3L)ri79c$  war (4 verschiedene Kombinationen), zeigten den mitotischen Phänotyp dieser Einzeldefizienzen, d.h.: der Phänotyp der Doppeldefizienzen glich jeweils den beschriebenen mutanten Phänotypen von  $Df(3L)BK10$  bzw.  $Df(3L)ri79c$ . In der letzten möglichen Kombination, mit Embryonen, die homozygot mutant für  $Df(2R)ed dp$  und  $Df(3R)Tl^P$  waren, wurde ein Teilungsmuster wie im Wildtyp festgestellt.

Es wurde somit gezeigt, daß sich in Embryonen, die homozygot oder transheterozygot für  $Df(3L)ri79c$  oder  $Df(3L)rdgC^{co2}$ , oder homozygot für  $Df(3L)BK10$  sind, die Zellen des Mesoderms (MD10) und MD8 vorzeitig teilen, und daß es sich dabei nicht um eine zusätzliche Teilung handelt. Beide mitotischen Domänen liegen auf der Ventralseite des Embryos. Die Teilungsanomalien in den Mutanten fielen somit genau

in den Bereich, in dem *snail* und *twist* gemeinsam exprimiert sind, womit sich die Frage nach einer möglichen Kontrolle der Zellteilungen auf der ventralen Seite durch *snail* oder *twist* stellt. Diese Frage wird in Kap. 2.4.6 näher behandelt. Außerdem findet man in den mutanten Embryonen, daß es vereinzelt zu Teilungen der Polzellen kommt, was in dieser Phase der Entwicklung normalerweise nie zu beobachten ist. Eine funktionelle Redundanz zwischen den in den beiden Regionen aufgedeckten Loci konnte genetisch nicht festgestellt werden. Die durch die beiden Defizienzen *Df(2R)ed dp* und *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* aufgedeckten Loci haben, soweit untersucht, keine Bedeutung für Zellteilungen in Zellzyklus 14.



**Abb. 2.35** : Überexpression von string im Mesoderm löst dort frühzeitigen Zellteilungen aus und bewirkt einen starken Defekt bei der Ventralfurchenbildung.

#### **2.4.2 Frühzeitige Mitosen sind die Ursache für die Störung der Ventralfurchenbildung in *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>***

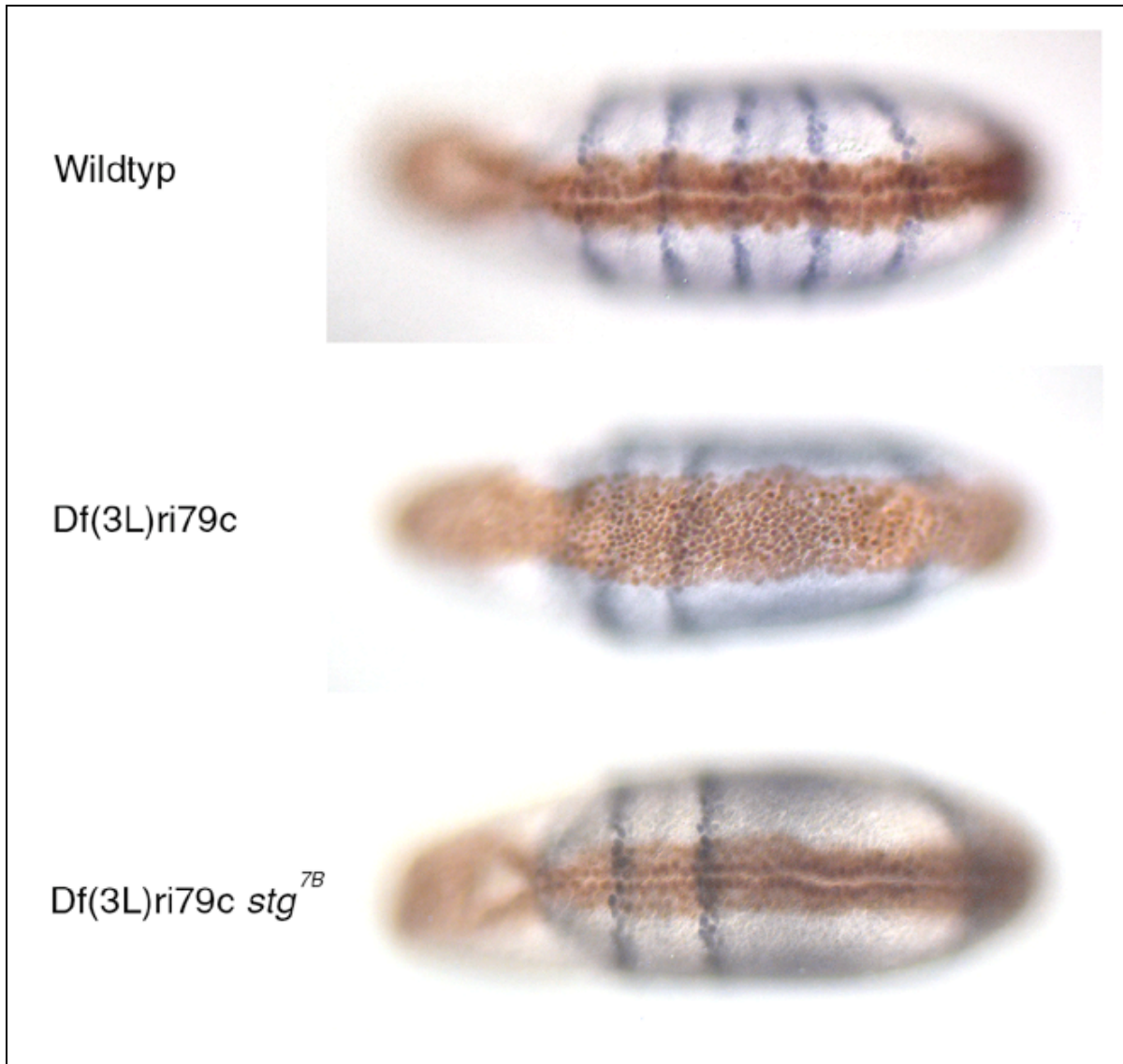
Nachdem nachgewiesen war, daß sich in Embryonen, die homozygot mutant für *Df(3L)BK10* bzw. *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind, die Zellen des Mesoderms vorzeitig teilen, stellte sich die Frage, ob dieser Phänotyp in einem kausalen Zusammenhang mit der gestörten Ventralfurchenbildung in diesen Mutanten steht. Normalerweise teilt sich die überwiegende Mehrzahl der mesodermalen Zellen erst nach der Invagination der Mesodermanlage. Es erschien daher wichtig zu untersuchen, ob frühzeitige Teilungen in der Mesodermanlage zu einer Störung der Ventralfurchenbildung führen können. Es war zwar schon früher berichtet worden, daß die ubiquitäre Überexpression von *Cdc25<sup>string</sup>* in Embryonen des Blastodermstadiums vorzeitige Mitosen im Mesoderauslösen kann (Edgar and O'Farrell, 1990; Foe et al., 1993), um aber indirekte Effekte, beispielsweise durch mögliche Wechselwirkungen mit den Nachbargeweben des Mesoderms auszuschließen, wurde ein Konstrukt hergestellt, mit dem *Cdc25<sup>string</sup>* spezifisch im Mesoderm überexprimiert werden kann. In diesem Konstrukt, 2xPEe-*stg*, steht die Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* unter der Kontrolle des proximalen Elements (PE) des Promotors von *twist*. *dorsal* bindet an dieses Promotor-Element und aktiviert die Transkription des daran gekoppelten Gens (s. Kap. 2.2). Mit diesem Konstrukt wurden Fliegen transformiert und mehrere Fliegenstämme mit unabhängigen Insertionen etabliert. Mit Hilfe von DIG-markierten RNA-Sonden wurden an Embryonen dieser Stämme in situ-Hybridisierungen durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob *Cdc25<sup>string</sup>* tatsächlich im Mesodermprimordium überexprimiert wird. Es zeigte sich, daß *Cdc25<sup>string</sup>* in verschiedenen Linien verschieden stark im Bereich der Mesodermanlage exprimiert wird. Dabei gab es einige Linien, in denen eine starke Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* festgestellt werden konnte. Dies ergab sich aus dem Vergleich der Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* im Mesoderm mit der in anderen Domänen. Die Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* im Bereich des Mesoderms war stärker als in anderen frühen Domänen, etwa MD1 oder MD4. Embryonen einer stark exprimierenden Linie (#M3b, s. Abb. 2.35) wurden auf Teilungsverhalten der mesodermalen Zellen und deren

Ventralfurchenbildung untersucht. Dazu wurden Embryonen dieses Stamms mit Antikörpern gegen PH3 oder Twist gefärbt. Es zeigte sich, daß in Embryonen, in deren Mesodermanlage Cdc25<sup>string</sup> überexprimiert wurde, die mesodermalen Zellen vorzeitig in Teilung gehen. In diesen Embryonen sind die mesodermalen Zellen die ersten, die sich in Zellzyklus 14 teilen. Mit Hilfe der Markierung gegen Twist konnte gezeigt werden, daß in solchen Embryonen schwere Gastrulationsdefekte auftreten. Die Ventralfurchenbildung in diesen Embryonen ist stark verzögert. Damit war gezeigt, daß die Teilungsaktivität der mesodermalen Zellen während der Ventralfurchenbildung Defekte bei der Mesoderminvagination verursacht. Zum Vergleich wurden Embryonen von zwei Linien (#M1, #M6b) untersucht, in denen durch die in situ-Hybridsierung nur eine geringe Erhöhung der Expression von Cdc25<sup>string</sup> in der Mesodermanlage festgestellt worden war. In Embryonen dieser Linien wurden weder im Teilungsmuster noch bei der Ventralfurchenbildung Defekte beobachtet. Die Menge an Cdc25<sup>string</sup>-RNA war also entscheidend für die Auslösung frühzeitiger Teilungen im Mesoderm bei diesem Experiment.

Auch die umgekehrte Kausalität war denkbar. Es könnte sein, daß eine normale Ventralfurchenbildung dafür sorgt, daß die mesodermalen Zellen sich nicht frühzeitig, sondern erst nach der Invagination teilen. Eine Störung der Zellformänderungen würde dann dazu führen, daß die Zellen des Mesoderms sich vorzeitig teilen. Dies wurde jedoch in verschiedenen Mutanten, in denen Zellformänderungen und Ventralfurchenbildung gestört sind, etwa in Embryonen, die mutant für *folded gastrulation* oder *twist* sind, nicht beobachtet. Gleiches gilt auch für Embryonen, die homozygot defizient für *Df(2R)ed dp* oder *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* sind (s. oben).

Damit war nachgewiesen, daß Teilungen der mesodermalen Zellen zu einem Zeitpunkt, wo normalerweise die Ventralfurchenbildung stattfinden würde, zu Defekten bei der Invagination des Mesoderms führen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurde dann untersucht, ob dieselbe Kausalität auch für die Defekte in Embryonen gilt, die homozygot mutant für *Df(3L)BK10* bzw. *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind: Sind die verfrühten Teilungen der mesodermalen Zellen in den Mutanten für die Gastrulationsdefekte verantwortlich? Wäre dies der Fall, dann müßte eine Unterbindung

der Teilungen dazu führen, daß die Gastrulationsdefekte supprimiert werden können. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Doppel-Mutanten hergestellt, in denen die



**Abb. 2.36:** Die Blockierung von Zellteilungen supprimiert den Gastrulationsphänotyp von *Df(3L)ri79c*. Die fehlenden Eve-Streifen identifizieren die homozygoten Rekombinanten, da durch die Defizienz auch das Gap-Gen *knirps* deletiert wird. Dies zeigt, daß Zellteilungen für den Gastrulationsdefekt verantwortlich sind.

Deletion *Df(3L)ri79c* mit einem Null-Allel von *Cdc25<sup>string</sup>*, *stg<sup>7B</sup>* (beide kartieren auf das dritte Chromosom), durch Rekombination kombiniert wurde. Wie in der Einleitung erläutert, löst die zygotische Aktivität von *Cdc25<sup>string</sup>* die Teilungen in den mitotischen Domänen aus. Mutationen in *Cdc25<sup>string</sup>* unterbinden die Teilungen in den mitotischen Domänen, führen aber nicht zu Störungen bei der Ventralfurchenbildung (Leptin and Grunewald, 1990). Embryonen mutant für das rekombinante Chromosom wurden gegen Twist und Even-skipped gefärbt. Die Even-skipped-Färbung ermöglicht die Identifizierung von homozygot mutanten Embryonen, da in *Df(3L)ri79c* das Gap-Gen *knirps* fehlt, das im posterioren Bereich des Embryos an der Kontrolle der Expression von *even-skipped* beteiligt ist. In *knirps*-Mutanten ist die Ausbildung der posterioren *even-skipped*-Streifen gestört. In Embryonen homozygot mutant für *Df(3L)ri79c* und *stg<sup>7B</sup>* finden in Zellzyklus 14 keine Teilungen statt. Die Gastrulation in diesen Embryonen läuft völlig normal ab und ist von der in Wildtyp-Embryonen nicht zu unterscheiden. Der Gastrulationsdefekt von Embryonen mutant für *Df(3L)ri79c* konnte also durch die Blockierung der Zellteilungen gerettet werden. Dadurch wurde nachgewiesen, daß die frühzeitigen Teilungen der mesodermalen Zellen die Ursache für den Gastrulationsdefekt sind. Die analoge Rekombinante, eine Doppelmutation aus *Df(3L)BK10* und *string* wurde von Jörg Großhans hergestellt und analysiert. Auch in diesem Fall wurde durch die Blockierung der Zellteilungen der Gastrulationsphänotyp supprimiert (J. Großhans, persönliche Mitteilung).

Die Experimente, in denen *Cdc25<sup>string</sup>* im Mesoderm überexprimiert wurde, zeigten, daß eine ausreichend hohe *Cdc25<sup>string</sup>*-Expression frühzeitige Mitosen auslösen kann. Es lag daher nahe anzunehmen, daß in den homozygot defizienten Embryonen möglicherweise die Kontrolle der Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* im Mesoderm gestört war und erhöhte Werte angenommen hatte. Embryonen transheterozygot für *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* wurden jeweils mit Hilfe einer DIG-markierten RNA-Sonde und parallel mit anti-*Cdc25<sup>string</sup>* Antikörpern gefärbt. Weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene konnte im Mesoderm der gefärbten Mutanten eine erhöhte Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* festgestellt werden (Seher and Leptin, 2000).

Somit war gezeigt, daß frühzeitige Teilungen der mesodermalen Zellen zu schweren Gastrulationsdefekten führen können, und daß dies in den untersuchten Mutanten der Grund für den mutanten Ventralfurchenphänotyp ist. Der von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* aufgedeckte Locus ist für die Kontrolle der Teilungen im Mesoderm notwendig. Eine quantitative Veränderung der Expression von *Cdc25<sup>string</sup>* scheint nicht der Grund für den mutanten Phänotyp zu sein.

### **2.4.3 Feinkartierung des von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* aufgedeckten Locus und Identifizierung des Gens, dessen Verlustmutation zu dem mitotischen Phänotyp im Mesodermprimordium führt**

Nach der Charakterisierung des mutanten Phänotyps von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* und dem Nachweis, daß im Wildtyp mit Hilfe des aufgedeckten Locus sichergestellt wird, daß sich die mesodermalen Zellen erst nach der Invagination des Mesoderms teilen, weil es sonst zu schweren Störungen der Ventralfurchenbildung kommt, wurde versucht, das Gen zu identifizieren, dessen Verlustmutation für den Phänotyp verantwortlich ist.

Mit genetischen Methoden wurde versucht, den aufgedeckten Locus genauer zu kartieren. Dazu standen prinzipiell zwei Wege offen: Die Analyse bereits bestehender Mutationen, die in interessierende Region kartieren oder die Erzeugung neuer Mutationen durch eine EMS-Mutagenese. Abgesehen davon, daß es effizienter sein kann zunächst bereits bestehende Mutationen zu analysieren, sprach vor allem ein Argument gegen die Durchführung einer Mutagenese:

Bei dem durch die vorzeitigen Zellteilungen verursachten Gastrulationsdefekt handelt es sich um einen vorübergehenden Defekt. Das Mesoderm gelangt in den Mutanten meist in das Innere des Embryos und entwickelt sich zumindest in der Phase direkt nach der Invagination normal weiter. Es ist daher fraglich, ob eine Verlustmutation des gesuchten Gens zu Letalität führen würde. Eine Mutagenese wäre aber nur sinnvoll, wenn sie auf einer anzunehmenden Letalität basieren würde. Eine Mutagenese für einen nicht-essentiellen Locus würde einen sehr hohen Arbeits- und vor allem Zeitaufwand erfordern (s. Einleitung und Kap. 2.1).

Daher wurden zunächst bereits existierende Stämme untersucht. Die publizierten Kartierungen der beiden Defizienzen *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* grenzten den zu untersuchenden Bereich auf die Region 77C ein. Eine Datenbankrecherche (Flybase) ergab, daß Fliegenstämme mit Mutationen existierten, die in die zu untersuchende Region kartierten. Nach der Art der Mutation lassen sich diese in die folgenden Klassen gliedern:

- 1) Fliegenstämme mit chromosomalen Aberrationen, vor allem Deletionen
- 2) Fliegenstämme mit EMS-induzierten Punktmutationen
- 3) Fliegenstämme, die P-Element-Insertionen tragen

Die Stämme wurden angefordert und wie folgt analysiert: Von jedem dieser Stämme wurden Embryonen gesammelt und mit Antikörpern gegen Twist (zur Untersuchung der Mesodermmorphogenese) sowie gegen PH3 (zur Untersuchung der Zellteilungen) gefärbt.

#### 1) Chromosomale Aberrationen

Nur wenige chromosomale Aberrationen kartierten in den interessierenden Bereich. Da mit ihnen eine weitere Eingrenzung des gesuchten Locus nicht zu erwarten war konzentrierte ich mich auf die Punktmutanten.

#### 2) EMS-induzierte Punktmutationen

Es wurden mehr als 40 Stämme mit EMS-induzierten Punktmutationen gefunden, die in den überlappenden Bereich von *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* kartierten. Diese wurden angefordert und analysiert. Die Mehrzahl der Stämme stammten aus dem Labor von M. Fortini. Dort wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt, deren Ziel es war, Mutationen des Drosophila-Orthologs von Presenilin zu erzeugen. Dazu sollten alle Komplementationsgruppen mutagenisiert werden, deren Verlustmutation zu Letalität führt und die Deletion *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* nicht komplementiert. Durch letztere Bedingung war der von mir zu untersuchende Bereich also Teil des Zielgebiets der Mutagenese. Durch die Mutagenese wurden insgesamt 20 essentielle Komplementationsgruppen



identifiziert. Diese wurden im Labor von M. Fortini gegen *Df(3L)ri79c* komplementiert. Von den 20 gefundenen Komplementationsgruppen komplementieren 13 weder *Df(3L)ri79c* noch *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>*. Die Mutagenese kann als sättigend angesehen werden, da die meisten Loci mehr als einmal (bis zu 8 mal) mutagenisiert wurden. Alle 13 Komplementationsgruppen wurden von mir untersucht. Mit bis zu zwei Mutationen pro Komplementationsgruppe handelte es sich um insgesamt 23 Linien. Von jedem dieser Stämme wurden Embryonen gesammelt, wie oben beschrieben gefärbt und anschließend analysiert. Keine der untersuchten Mutationen löste einen anormalen Zellzyklus- oder Gastrulationsphänotyp aus.

Dieses Ergebnis, zusammen mit der Einschätzung, daß die Mutagenese ausreichend sättigend war, unterstützte die Vermutung, daß es sich bei dem Gen, dessen Verlustmutation den Zellzyklusphänotyp verursacht, um ein nicht-essentielles Gen handeln mußte.

### 3) P-Element-Insertionen

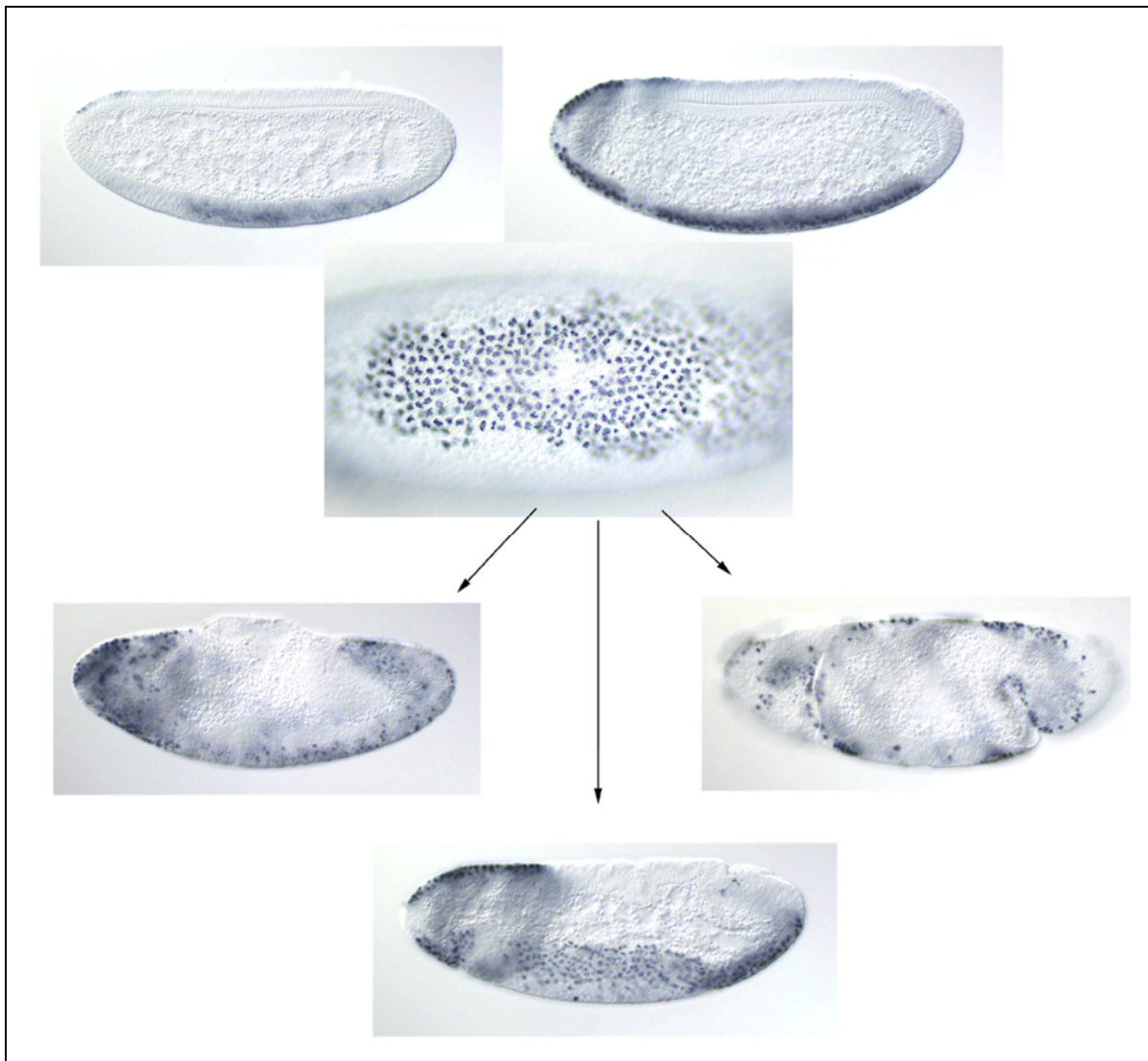
Eine Reihe von P-Element-Insertionen existieren, die in die zu untersuchende Region kartieren. Jede dieser Insertionen ist durch einen mehr oder minder gut charakterisierten mutanten Phänotyp gekennzeichnet. Dabei sind auch einige Insertionen, die Mutationen in nicht-essentiellen Genen induzieren, aber männliche oder weibliche Sterilität verursachen. Embryonen aller erworbenen Stämme mit P-Element-Insertionen wurden auf die beschriebene Weise analysiert. In keinem der untersuchten Stämme konnten Zellteilungs- oder Gastrulationsdefekte festgestellt werden.

*Die Identifizierung des Gens, dessen Verlust in *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* zu Zellteilungs- und Gastrulationsdefekten führt*

Zuletzt blieb ein einziger Stamm übrig, der noch zu analysieren war. Dabei handelte es sich um einen Stamm mit einer Insertion einer speziellen Form eines P-Elements, ein sogenanntes EP-Element. Das inserierte Konstrukt enthält dabei zusätzlich einen UAS-Promotor, an den das Protein Gal4 binden kann (Rørth, 1996). Dadurch

können Gene, in deren Nähe ein EP-Element inseriert ist, mit Hilfe einer Gal4-Treiberlinie gewebespezifisch überexprimiert werden. Mit Hilfe von EP-Elementen wurden erfolgreich Misexpressions-Screens durchgeführt (Rørth, 1996).

Embryonen dieses Stamms, EP(3)3519, die gegen Twist und PH3 gefärbt wurden, zeigten Defekte im Zellteilungsmuster und bei der Ventralfurcbenbildung. Diese stimmten mit denen überein, die in Embryonen, die homozygot defizient für *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* sind, festgestellt worden waren. Embryonen, die transheterozygot für



**Abb. 2.37:** *tribbles*-Mutanten zeigen eine phänotypische Bandbreite, die vermutlich der Grund für die beobachtete Semiletalität ist. Alle Embryonen stammen von der Linie EP(3)3519 und wurden mit anti-PH3 gefärbt.

EP(3)3519 und *Df(3L)ri79c* oder *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* waren, zeigten den gleichen mutanten Phänotyp. Damit war gezeigt, daß die EP-Element-Insertion eine Mutation des gesuchten Gens verursacht. Eine genaue phänotypische Analyse von homozygot mutanten Embryonen von EP(3)3519 ergab, daß sich sowohl das Mesoderm als auch MD8 frühzeitig teilten und in den mutanten Embryonen die ersten mitotischen Domänen bildeten. Ebenso konnten Teilungen der Polzellen während der Gastrulation festgestellt werden. Da in diesem Stamm im Gegensatz zu den vorher untersuchten Deletionen *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* nicht eine Vielzahl von Genen, sondern vermutlich nur das gesuchte Gen mutiert ist, konnte der mutante Phänotyp genauer untersucht werden. Es zeigte sich, daß der Gastrulationsdefekt verschieden starke Auswirkungen auf die weitere Entwicklung der Embryonen hat (s. Abb. 2.37). Bei einem Teil der Embryonen kommt es nach der Invagination des Mesoderms zu einer Blockierung der Keimstreifaussteckung oder zu einer Verdrillung des gesamten Embryos. In diesen Fällen verursacht die Mutation somit Letalität. Bei anderen Embryonen invaginiert das Mesoderm ebenfalls und Keimstreifausstreckung und weitere Morphogenese des Mesoderms erscheinen nahezu normal. Um zu überprüfen, ob solche Embryonen die Entwicklung komplettieren und vitale Larven hervorbringen, wurden lebende Embryonen beobachtet und nach Phänotypen sortiert. Lebende Embryonen, die noch nicht das Gastrulationsstadium erreicht hatten, wurden unter 3SVoltalef-Öl aufgereiht und beobachtet. Wenn Embryonen das Gastrulationsstadium erreichten, wurden sie unter dem Mikroskop genauer beobachtet. Embryonen, deren Gastrulation verzögert oder gestört war, wurden heraussortiert. Diese wurden getrennt aufgereiht und ihre weitere Entwicklung verfolgt. Sie ließen sich wie bereits die gefärbten Embryonen phänotypisch in zwei Gruppen aufteilen. Embryonen mit schweren Defekten wie Verdrillung oder Blockierung der Keimstreifausstreckung bildeten die eine Gruppe. Keiner von diesen Embryonen vollendete die Embryonalentwicklung. Es schlüpften von diesen keine Larven. In die andere Gruppe fielen die Embryonen, die nach anfänglichen Gastrulationsdefekten eine normale Embryonalentwicklung zu durchlaufen schienen. Von diesen schlüpften zahlreiche Larven (Quote nicht ermittelt). Von diesen Beobachtungen ausgehend wurde vermutet, daß ein Teil der Embryonen möglicherweise die gesamte Entwicklung durchlaufen und Adulte hervorbringen kann. Um dies zu

überprüfen, wurden adulte Fliegen phänotypisch untersucht. Die Mutation des Stammes EP3519 wird heterozygot über dem Balancerchromosom TM6B gehalten, das mit der dominanten Mutation *Tubby* markiert ist. In der Fliegenpopulation dieses Stammes gibt es immer Fliegen, die das Balancer-Chromosom nicht haben. Nur diese Fliegen haben außerdem eine dunklere Augenfarbe (orange gegenüber gelb bei den Heterozygoten). Da das EP-Element mit einem *white*-Minigen ausgestattet ist, läßt sich schließen, daß es sich bei diesen Fliegen um homozygot mutante Fliegen handelt. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, daß in den Kulturflaschen der Fliegen Puppen gefunden werden, die nicht den *Tubby*-Phänotyp (kurz und abgerundet) zeigen, sondern wie Wildtyp-Puppen aussehen. Solche Puppen müssen homozygot mutant sein, da sie aus heterozygot mutanten Fliegen hervorgehen. Aus manchen dieser Puppenhüllen schlüpfen Fliegen.

Die Verlust des identifizierten Genes ist somit semiletal. Dies erklärt, warum es in der von M. Fortini und Kollegen durchgeführten EMS-Mutagenese nicht identifiziert wurde. Um zu überprüfen, ob homozygot mutante Fliegen fertil sind, wurden Männchen und Jungfrauen dieses Genotyps gekreuzt. Die Fliegen wurden in Kulturflaschen gesetzt um eine homozygot mutante Linie zu etablieren. Sie produzierten fast keine Nachkommen. Um zu überprüfen, die Fliegen möglicherweise steril sind, wurden Männchen und Jungfrauen jeweils gegen Wildtyp-Fliegen gekreuzt. Während die homozygot mutanten Männchen mit Wildtyp-Weibchen zahlreiche Nachkommen produzierten und keine Anzeichen von Sterilität zeigten, legten die homozygoten Weibchen, die mit Wildtyp-Männchen gekreuzt wurden, nur sehr wenige Eier ab, aus denen so gut wie keine Larven schlüpften. Bei einer Untersuchung der Ovarien der homozygot mutanten Weibchen konnten keine offensichtlichen Defekte der Oogenese oder der Morphologie der Ovarien festgestellt werden. Weitere Untersuchungen zur Ursache für die Sterilität wurden nicht durchgeführt.

#### 2.4.4 Die Identifizierung des Transkripts von *tribbles*

##### *Namensgebung*

Nach der Identifizierung des Gens, daß für den Zellteilungs- und Gastrulationsdefekt in verantwortlich ist, wurde das Gen *tribbles* (*trbl*) genannt. Tribbles sind fiktive kleine Organismen, die sich nach Kontakt mit Wasser unkontrolliert teilen (Okuda and Okuda, 1997).

##### 2.4.4.1 Identifizierung des Transkripts:

##### cDNA-Sequenz und Genomische Struktur von *tribbles*

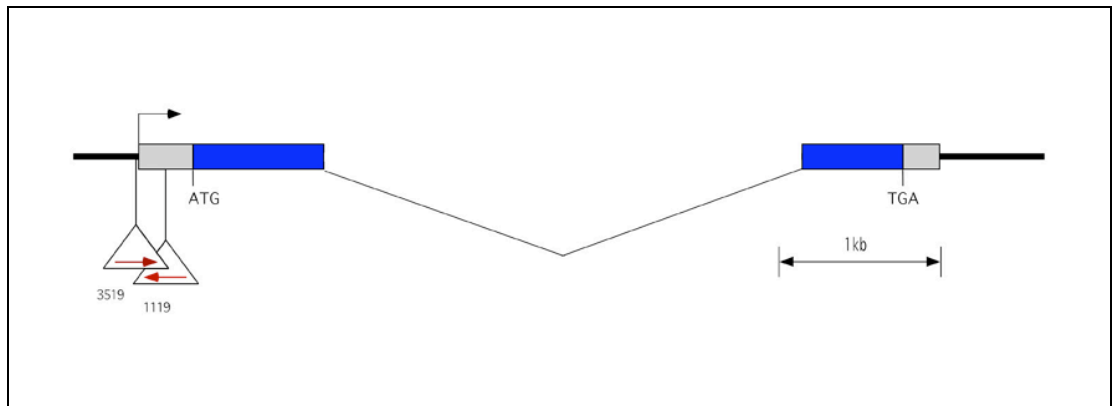
Für viele P-Element-Insertionen in *Drosophila* wurden die flankierenden Regionen des Genoms sequenziert (Berkley Drosophila Genome Projects, BDGP). Die Sequenzen sind in der Datenbank Flybase oder in der Datenbank des BDGP abrufbar. Eine Datenbankrecherche ergab, daß die flankierenden Sequenzen des EP-Elements des Stammes EP(3)3519 verfügbar sind. Mit Hilfe der dort gefundenen Sequenz wurden weitere Datenbankabfragen durchgeführt. Die Recherche ergab, daß mehrere ESTs existieren, deren Sequenz mit der flankierenden Sequenz des EP-Elements überlappte und im Überlappungsbereich zu 100% übereinstimmte. Die ESTs waren untereinander nahezu identisch, sie unterschieden sich nur in ihrer Länge. Außerdem wurde eine weitere Fliegenlinie mit einer EP-Insertion gefunden, EP(3)1119, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht kartiert war, deren flankierende Sequenzen aber mit den gleichen EST-Sequenzen perfekte Übereinstimmungen ergab, ebenso wie die von EP(3)3519. EP(3)1119 und die in der Datenbank identifizierten ESTs wurden angefordert und analysiert.

Der Stamm EP(3)1119 zeigte den gleichen mutanten Phänotyp wie EP(3)3519. Alle Aspekte des Phänotyps wurden in mutanten Embryonen dieses Stamms gefunden. Das gleiche galt für Embryonen die transheterozygot für die beiden Mutationen waren.

In beiden Stämmen verursachen die EP-Element-Insertionen somit Mutationen in *tribbles*.

Zwei ESTs wurden analysiert: SD04278 und LP01915 (BDGP). Die cDNAs wurden sequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß beide cDNAs für das gleiche Transkript kodieren. Es handelt sich um eine 2038 bp lange Sequenz. Darin konnte ein offenes Leseraster (im weiteren ORF, open reading frame, genannt) identifiziert werden. Dieses beginnt in der vollständigen cDNA-Sequenz bei Basenpaar (bp) 333 und endet bei bp 1787. Die vollständige Sequenz wurde an NCBI übermittelt (accession number: AF204688).

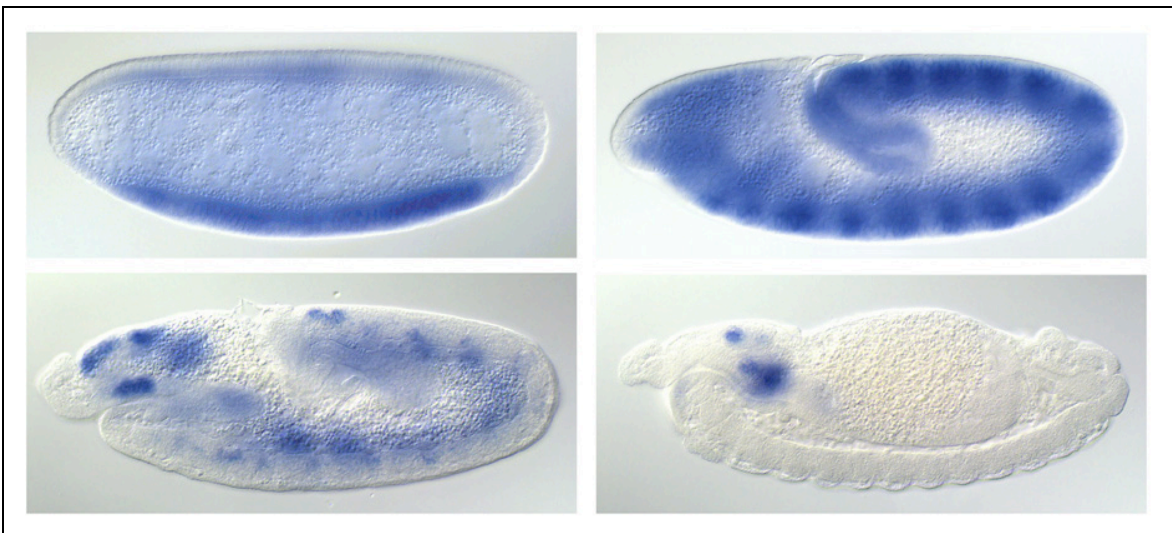
Mit Hilfe der Sequenzen der die EP-Insertionen flankierenden Regionen konnte in der Datenbank ein genomisches Fragment identifiziert werden, das dazu benutzt wurde, die cDNAs zu kartieren und die genomische Struktur des korrespondierenden Gens zu ermitteln. Die genomische Analyse ergab, daß das zur cDNA korrespondierende Gen aus 2 Exons besteht. Diese sind durch ein 2950 bp langes Intron getrennt (s. Abb. XX). Mit Hilfe der Sequenz der flankierenden Regionen konnten auch die Insertionspunkte der EP-Elemente in den Stämmen EP(3)1119 und EP(3)3519 bestimmt werden. In EP(3)1119 ist das EP-Element 186 bp nach dem und in EP(3)3519 nur 8 bp vor dem vermutlichen Transkriptionsstart inseriert (s. Abb. 2.38).



**Abb. 2.38:** Genomische Organisation von *tribbles* und die Insertionspunkte der beiden EP-Elemente, sowie deren Orientierung.

Die cDNAs wurden benutzt, um DIG-markierte RNA-Sonden herzustellen. In situ-Hybridisierung an Wildtyp-Embryonen zeigte, daß die RNA bereits in frisch abgelegten Eiern nachweisbar ist. Die RNA ist in diesen ubiquitär lokalisiert. Dies bleibt so bis gegen Ende der Zellularisierung. Dann verschwindet die maternale RNA allmählich. Ab Ende der Zellularisierung kann zygotisch exprimierte RNA nachgewiesen werden. Die erste Region, wo die RNA dann nachgewiesen werden kann, ist die Mesodermanlage. Die RNA wird auch in allen späteren Stadien der Embryonalentwicklung in einem dynamischen Expressionsmuster gefunden (s. Abb. 2.39).

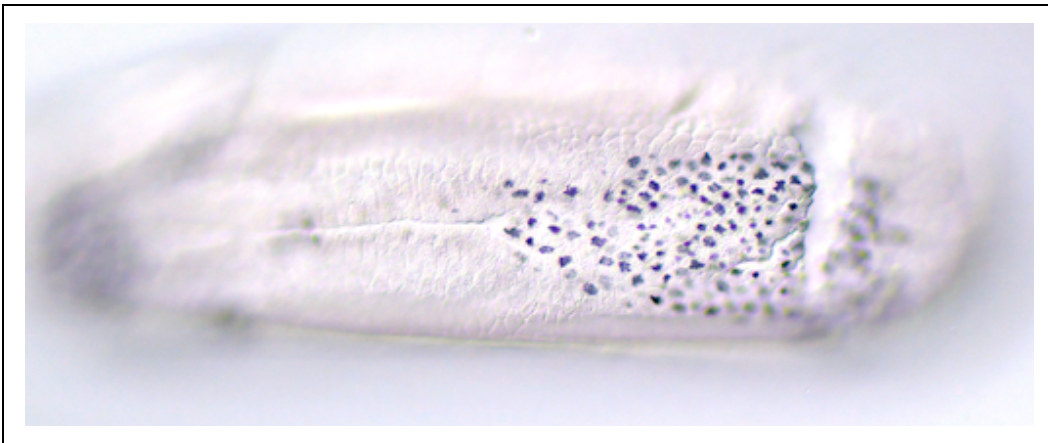
Durch Mobilisierung (hop out) des EP-Elements von EP(3)3519 konnten Revertanten erzeugt werden, die keinen *tribbles*-Phänotyp mehr zeigten. Dies wurde als weiteres Indiz dafür gewertet, daß es sich beim untersuchten Gen um handelt.



**Abb. 2.39:** RNA-Expressionsmuster von *tribbles*. Zu Beginn der Gastrulation ist *tribbles* in der Mesodermanlage exprimiert.

Um zu klären, ob es sich bei dem untersuchten Transkript tatsächlich um die cDNA von *tribbles* handelte, wurde von einer der sequenzierten cDNAs doppelsträngige RNA (dsRNA) hergestellt. Durch Injektion von ds(RNA) lassen sich Verlustmutationen der zur ds(RNA) korrespondierenden Gene phänotypieren. Dies wurde mittlerweile in einer Vielzahl von Organismen erfolgreich getestet (Kennerdell and Carthew, 1998;

Montgomery et al., 1998). Mit dieser wurden dann RNA-interference-Experimente (RNAi-Experimente) durchgeführt. Dazu wurde dsRNA von *tribbles* hergestellt und in das posteriore Ende von Wildtyp-Embryonen injiziert. Diese wurden unter 10S Voltalef-Öl beobachtet und, wenn die Mehrzahl der Embryonen sich dem Ende des Zellularisierungsstadium näherten, fixiert und anschließend gegen PH3 oder Twist gefärbt. Kontroll-Embryonen wurden mit 0.1x PBS injiziert und ebenfalls gegen PH3 gefärbt. Viele der mit der dsRNA injizierten Embryonen zeigten starke Gastrulationsdefekte in Twist-Färbungen. In den gegen PH3 gefärbten Embryonen konnten verfrühte Zellteilungen in der Mesodermanlage nachgewiesen werden (s. Abb. 2.40). Dabei zeigte sich, daß diese oft am posterioren Ende des Embryos lokalisiert waren. Dies war die Region, wo die dsRNA injiziert worden war. In einigen PH3-gefärbten Embryonen konnte festgestellt werden, daß die Ventralfurche nur zur Hälfte ausgebildet war, meist in



**Abb. 2.40:** Der Phänotyp von *tribbles* kann durch Injektion von doppelsträngiger RNA von *tribbles* im Bereich der Injektionsstelle phänokopiert werden.

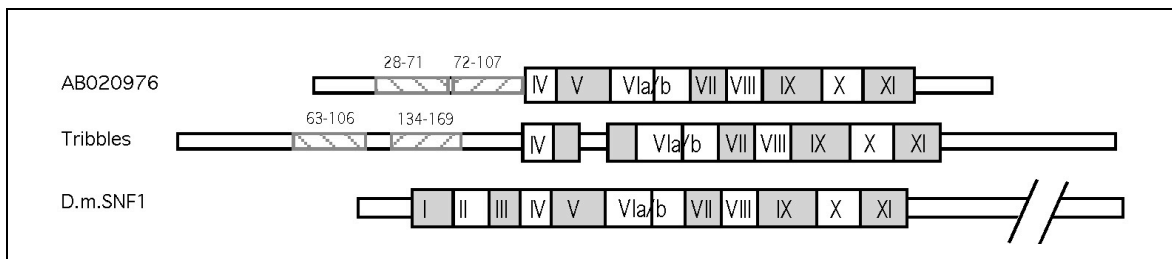
der anterioren Hälfte des Embryos. In diesem Bereich wurden keine vorzeitigen Mitosen in der Mesodermanlage gesehen. In der posterioren Hälfte hingegen, wo keine Invagination stattfand, teilten sich in diesen Embryonen die mesodermalen Zellen vorzeitig (s. Abb. 2.40). Die Kontroll-Embryonen zeigten keine Zellteilungsdefekte.

Die Ergebnisse der RNAi-Experimente, zusammen mit der erfolgreichen Revertierung des mutanten Phänotyps, den Färbungen der RNA-in-situ-Hybridisierungen und den Kartierungen der EP-Element-Insertionen zeigten, daß es sich bei dem identifizierten Transkript um *tribbles* handeln mußte.



#### 2.4.4.2 Die Proteinsequenz von *tribbles*

Die Übersetzung der Sequenz des offenen Leserasters in die zugehörige Aminosäuresequenz zeigte, daß *tribbles* für ein Protein kodiert, das große Ähnlichkeit hat mit Serin/Threonin-Kinasen der SNF1-Klasse (die Kin1/SNF-1/NIM1-Superfamilie). Die gemeinsame Charakteristik aller Kinasen ist die Kinase-Domäne. Diese besteht aus 11 (in der allgemein gültigen Nomenklatur mit I bis XI bezeichnet) nach ihrer Funktion unterschiedenen Teil- oder Subdomänen (die Subdomänen I bis III beispielsweise haben eine wichtige Funktion bei der Aufnahme und Orientierung von ATP, Domäne VIII spielt eine Schlüsselrolle bei der Erkennung des Peptid-Substrats). Die Domänen IV bis XI der



**Abb. 2.41:** Alignment des Tribbles Proteins gegen zwei verwandte Proteine: Die funktionelle Kinase SNF-1 aus *Drosophila* und ein EST aus Menschen, der uncharakterisiert ist, aber mit Tribbles gemeinsame Strukturmerkmale hat.

Kinase-Domäne von *tribbles* zeigten dabei hohe Konservierung im Vergleich mit SNF-1 von *Drosophila melanogaster*, wobei jedoch die Domänen I bis III wegen mangelnder Übereinstimmungen nicht identifiziert werden konnten (s. Abb. 2.41). Eine Datenbankrecherche identifizierte vier Vertebraten-Proteine, die ebenfalls eine große Übereinstimmung in der Primärsequenz mit Tribbles zeigten. (Mittlerweile sind drei weitere Proteine aus *Mus musculus*, die große Ähnlichkeit zu Tribbles zeigen, hinzugekommen.) Ihrer Übereinstimmung nach müssen diese als die bisher nächsten verwandten Proteine angesehen werden. Bei zweien von diesen handelt es sich um humane ESTs, die beiden anderen wurden aus Ratte und Hund isoliert. Auch die Vertebraten-Proteine zeigen vom Konsensus der Kinasen stark abweichende Sequenzen

in dem Bereich, in dem normalerweise die Subdomänen I bis III lokalisiert sind. Die vielleicht auffälligste gemeinsame Charakteristik der Vertebraten-Proteine und Tribbles ist, daß ein Asparagin aus Subdomäne VIb (N269 in Tribbles, N171 in Protein-Kinase A- $C^{\alpha}$ ), das normalerweise in allen Kinasen invariant ist, in den fünf Proteinen durch ein Arginin oder Lysin ersetzt ist (Seher, TC und Leptin, M, 2000). Gleiches gilt für L262 in der selben Subdomäne von Tribbles. In allen bisher bekannten Kinasen befindet sich an dieser Position ein Histidin (H164 in Protein-Kinase A- $C^{\alpha}$  = PKA- $C^{\alpha}$ , hier als Referenzkinase benutzt). Dadurch unterscheiden sich die genannten fünf Proteine von allen bisher beschriebenen Serin/Threonin-Kinasen und bilden daher vermutlich eine neue Subfamilie innerhalb der Kin1/SNF-1/NIM1-Superfamilie. Die in Tribbles und den anderen vier Proteinen in Subdomäne VIb gefundene Abänderung des Konsensus von **HRDLKXXN** in **//LRDLKXXL/K** könnte entscheidende Bedeutung für die Funktion von Tribbles und die verwandten Proteine haben. Die Subdomäne VIb und im besonderen das Konsensus-Motiv **HRDLKXXN** spielen eine wesentliche Rolle bei der katalytischen Reaktion aller Kinasen. Der Asparaginrest dieses Motivs, N171 in PKA- $C^{\alpha}$ , agiert in funktionellen Kinasen als Stabilisator der katalytischen Schleife. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß es sich bei Tribbles und den verwandten Vertebraten-Proteinen um inaktive oder “tote” Kinasen handelt.

#### 2.4.5 Überexpressions- und Injektionsexperimente mit *tribbles*

Eine offene Frage war, ob *tribbles* auch in anderen Entwicklungszusammenhängen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zellteilungen spielt. Das dynamische Expressionsmuster, das die gesamte Embryonalentwicklung über besteht, legte nahe, daß *tribbles* auch noch andere Funktionen hat. Außerdem wurde ja bereits festgestellt, daß homozygote Weibchen fast völlig steril sind und auch während der Larval- und Puppenentwicklung Semiletalität zu beobachten war. Es wurde daher versucht, *tribbles* gewebespezifisch überzuexprimieren. Wie beschrieben wurden EP-Elemente genau zu diesem Zweck konstruiert. Die Kartierung der EP-Element-Insertionen hatte ergeben, daß in einer der beiden EP-Linien (EP(3)3519) das EP-

Element mit dem dazugehörigen UAS-Promotor in Richtung von *tribbles* orientiert und 8 bp vor dem Transkriptionstart inseriert war. Damit sollte eine Überexpression prinzipiell möglich sein und wurde daher getestet.

Mit einer ganzen Palette von Gal4-Treiberlinien wurde versucht, *tribbles* während verschiedener Phasen der Entwicklung und in verschiedenen Geweben überzuexprimieren. Dazu gehörten das Mesoderm, das Ektoderm, die Augenimaginalscheibe und die Flügelimaginalscheibe. Überexpression in den Embryonen wurde mit einer *trbl*-spezifischen DIG-RNA-Sonde überprüft (Seher, TC und Leptin, M, 2000) und anschließend mit Hilfe von anti-PH3, anti-Twist oder anti-Even-skipped gefärbt, um eventuelle Zellteilungs- oder morphologische Defekte nachweisen zu können. In allen untersuchten Fällen konnte die RNA von *tribbles* im jeweiligen Zielgewebe nachgewiesen werden. Eine offensichtliche Änderung von Zellteilungsmustern konnte in keinem Fall beobachtet werden. Auch morphologische Defekte wurden nicht festgestellt. Embryonale Letalität konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Aus den Kreuzungen für die Überexpression schlüpften vitale, fertile Fliegen. Nach der Überexpression von *tribbles* in den Imaginalscheiben wurden adulte Fliegen, die aus den angesetzten Kreuzungen hervorgegangen waren, untersucht. Durch die Überexpression bedingte Letalität konnte nicht festgestellt werden. Augen- oder Flügelspezifische mutante Phänotypen wurden ebenfalls nicht gefunden. Für diese Ergebnisse gab es prinzipiell zwei Erklärungen:

Möglicherweise lassen sich durch Überexpression mit *tribbles* keine Defekte erzeugen. Es wäre möglich, daß Defekte nur dann auftreten, wenn die Aktivität von *tribbles* fehlt, möglicherweise sogar nur mesodermspezifisch.

Die andere Erklärung wäre, daß die mit dem EP-Element erzielte Expression nicht ausreicht, um damit Effekte zu erzielen. Möglicherweise spielt es in diesem Zusammenhang doch eine Rolle, daß das EP-Element nahe am Translationsstart sitzt.

*tribbles* wurde auch in 2 weiteren Labors identifiziert (Grosshans and Wieschaus, 2000; Mata et al., 2000). Sowohl J. Großhans und E. Wieschaus, als auch J. Mata et al. erzeugten Fliegenlinien, die mit UAS-*tribbles* -Konstrukten transformiert worden waren. Mit diesen wurden Überexpressionsexperimente durchgeführt, die zu Defekten führen. Wenn *tribbles* in der Flügelimaginalscheibe überexprimiert wurde, hatten die

resultierenden Fliegen Flügel, deren Zelldichte in der Expressionsdomäne von *tribbles* reduziert war. Somit hatte die Überexpression einen klaren Einfluß auf die Zellproliferation im Flügel. Dieses Ergebnis bestätigte damit auch indirekt die Annahme, daß sich mit Hilfe des EP-Elements in EP(3)3519 keine geeigneten Überexpressionsstudien durchführen lassen.

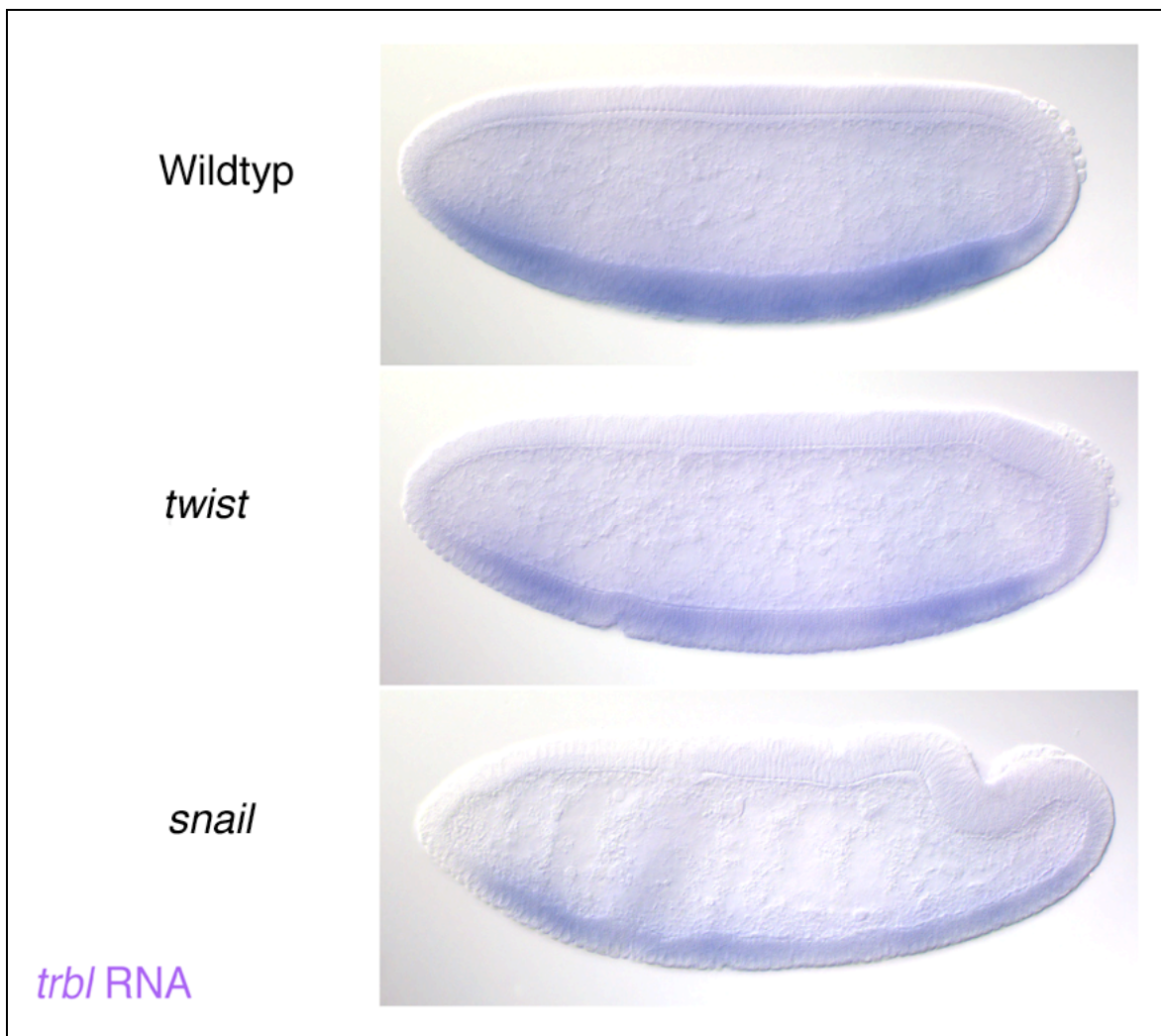
#### **2.4.5.1 Subzelluläre Lokalisation von HA-Tribbles und lokale Überexpression durch Injektionen**

Alle bisher gewonnenen Expressionsdaten zeigen, wann und in welchen Geweben *tribbles* RNA während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden kann. Über Funktion und Wirkungsort des Proteins war nichts bekannt. Ein Antikörper gegen Tribbles stand zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Um zu untersuchen, ob *tribbles* eine spezifische subzelluläre Lokalisation aufweist, wurde ein Fusionskonstrukt hergestellt, in dem die cDNA von *tribbles* mit der von Hämagglutinin kombiniert wurde (HA-*trbl*). Von diesem Konstrukt wurde in vitro HA-*trbl* RNA transkribiert. Diese wurde anschließend in Embryonen im Zellularisierungsstadium injiziert. Die injizierten Embryonen konnten sich weiter entwickeln und wurden danach fixiert und gefärbt. Dazu wurden die Embryonen mit Hilfe von anti-HA gefärbt. Die Auswertung der Färbungen ergab, daß HA-*trbl* innerhalb von Zellen stets im gesamten Zytoplasma nachgewiesen werden konnte. Eine spezifischere Lokalisation, etwa eine Anreicherung an den Membranen konnte nicht beobachtet werden. Es scheint sich bei Tribbles um ein zytoplasmatisches Protein zu handeln.

Bei der Untersuchung der Lokalisation von Tribbles innerhalb der Zelle war beobachtet worden, daß die Kerne im Bereich der Injektionsstelle in den gefärbten Embryonen oft größer erschienen. Um zu untersuchen, ob es sich dabei möglicherweise um die Folge eines Teilungsdefektes handelte, wurden mit HA-*trbl*-RNA injizierte Embryonen mit Mehrfachfärbungen analysiert. Es wurden drei Strukturen markiert: durch anti-HA die translatierte HA-*trbl*-RNA, durch anti-PH3 die phosphorylierte Form von Histon 3 (und damit Chromosomen im

mitotischen Stadium) und durch Hoechst 33258 die DNA. Die Kerne im Injektionsbereich dieser Embryonen waren größer, die Kerndichte in den betreffenden Regionen war auch deutlich niedriger. Die Zellen hatten sich bei Vergleich der Kerndichten vermutlich mindestens einmal weniger geteilt.

#### 2.4.6 Experimente zur Untersuchung der genetischen Regulation von *tribbles*

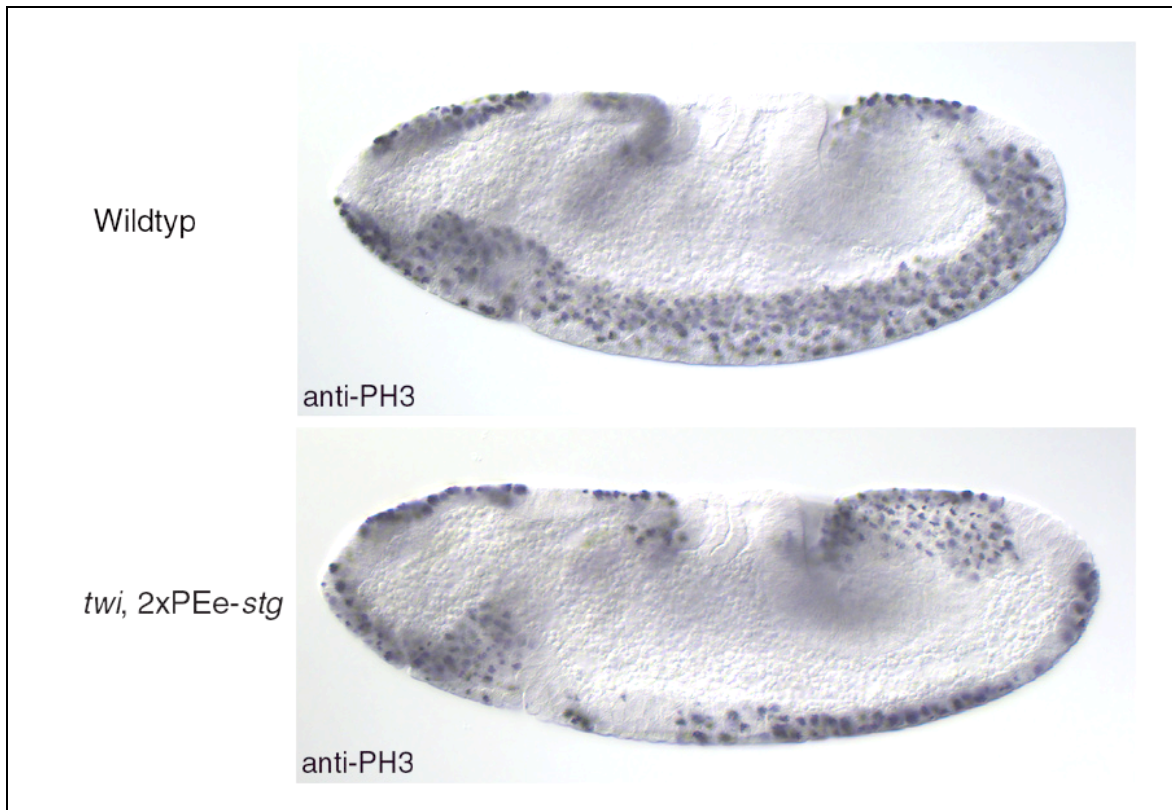


**Abb. 2. 42:** Expression von *tribbles* in *snail*- und *twist*- Mutanten.

Die in den *tribbles*-Mutanten gefundenen Zellteilungsdefekte beschränkten sich - abgesehen von den Teilungen der Polzellen - auf die mitotischen Domänen 8 und 10. Beide Domänen liegen auf der Ventralseite des Embryos und innerhalb der Region, in der sowohl *twist* als auch *snail* exprimiert sind. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß die Expression von *tribbles* durch *snail* oder *twist* reguliert wird. Wäre dies so, dann wäre im einfachsten Fall in *snail*- oder *twist*-Mutanten auch die Expression von *tribbles* blockiert. Dies wurde zuerst mit in situ Hybridisierungen untersucht. Embryonen mutant für *snail* oder *twist* wurden mit der DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert und gefärbt. In beiden Mutanten konnte *tribbles*-RNA in der Mesodermanlage nachgewiesen werden (s. Abb. 2.42). Die Expression schien jedoch in beiden Fällen erniedrigt zu sein. Dies ließ sich durch in situ-Hybridisierungen jedoch nicht quantifizieren. Deshalb sollte der Effekt von Mutationen für *snail* oder *twist* phänotypisch untersucht werden. Wäre in *twist*- oder *snail*-Mutanten die Aktivität von *tribbles* in der Mesodermanlage wirklich reduziert, so könnte das möglicherweise alleine schon zu verfrühten Zellteilungen führen, ähnlich wie man es in *tribbles*-Mutanten findet. Eine einfache Analyse von *snail*- und *twist*-Mutanten kann aber keinen Aufschluß geben, denn Mutationen für *snail* oder *twist* verändern die Expression von  $Cdc25^{Cdc25^{string}}$ . In beiden Mutanten ist  $Cdc25^{string}$  in der Mesodermanlage nicht exprimiert (Edgar et al., 1994a). Daher können Zellteilungen in der Mesodermanlage in diesen Mutanten nicht stattfinden und der Effekt auf *tribbles* phänotypisch nicht untersucht werden. Um dieses Problem experimentell zu umgehen, sollte  $Cdc25^{string}$  in der Mesodermanlage von *snail*- und *twist*-Mutanten exprimiert werden. Fliegenlinien, in denen die Expression von  $Cdc25^{string}$  unabhängig von *snail* oder *twist* unter der Kontrolle von Dorsal steht (2xPEe-*stg*), waren bereits erzeugt worden, um  $Cdc25^{string}$  spezifisch im Mesoderm überexprimieren zu können. Wie bereits vorher beschrieben, war  $Cdc25^{string}$  in einigen dieser Linien nur schwach überexprimiert und ein Zellzyklus- oder Gastrulationsphänotyp wurde nicht beobachtet. Eine der schwach exprimierenden 2xPEe-*stg*-Linien (#M6b), in der sich keinerlei Zellzyklus- oder Gastrulationsdefekte beobachten ließen, wurde dazu benutzt, um Rekombinanten mit *snail* (*sna*, 2xPEe-*stg*) oder *twist* (*twi*, 2xPEe-*stg*) zu erzeugen. Von den resultierenden Fliegenlinien wurden Embryonen gesammelt und diese mit Hilfe von anti-PH3 Antikörperfärbungen untersucht.

In homozygoten *twi*, 2xPEe-*stg*-Embryonen konnten keine verfrühten Teilungen der mesodermalen Zellen festgestellt werden. Es kommt in diesen Embryonen erst später zu Zellteilungen in der Mesodermanlage, zu einem Zeitpunkt, zu dem das Mesoderm in Wildtyp-Embryonen bereits invaginiert ist. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellteilungen in Wildtyp-Embryonen durch *tribbles* nicht mehr blockiert. Die Teilungskinetik der mesodermalen Zellen in homozygoten *twi*, 2xPEe-*stg*-Embryonen ähnelt somit der Situation in Wildtyp-Embryonen, auch wenn keine Invagination des Mesoderms stattgefunden hat. Insgesamt teilen sich in den untersuchten Embryonen aber weniger Zellen als in Wildtyp-Embryonen. Es teilen sich nicht alle Zellen der Mesodermanlage (s. Abb. 2.43).

Die Situation in homozygoten *sna*, 2xPEe-*stg*-Embryonen ist anders. Hier teilen sich die mesodermalen Zellen zu einem Zeitpunkt, wo die Invagination des Mesoderms in Wildtyp-Embryonen gerade erst eingesetzt hätte (s. Abb. 2.44). Die Teilungen erstrecken sich in anterior-posteriorer Richtung über das gesamte Mesoderm. Insgesamt

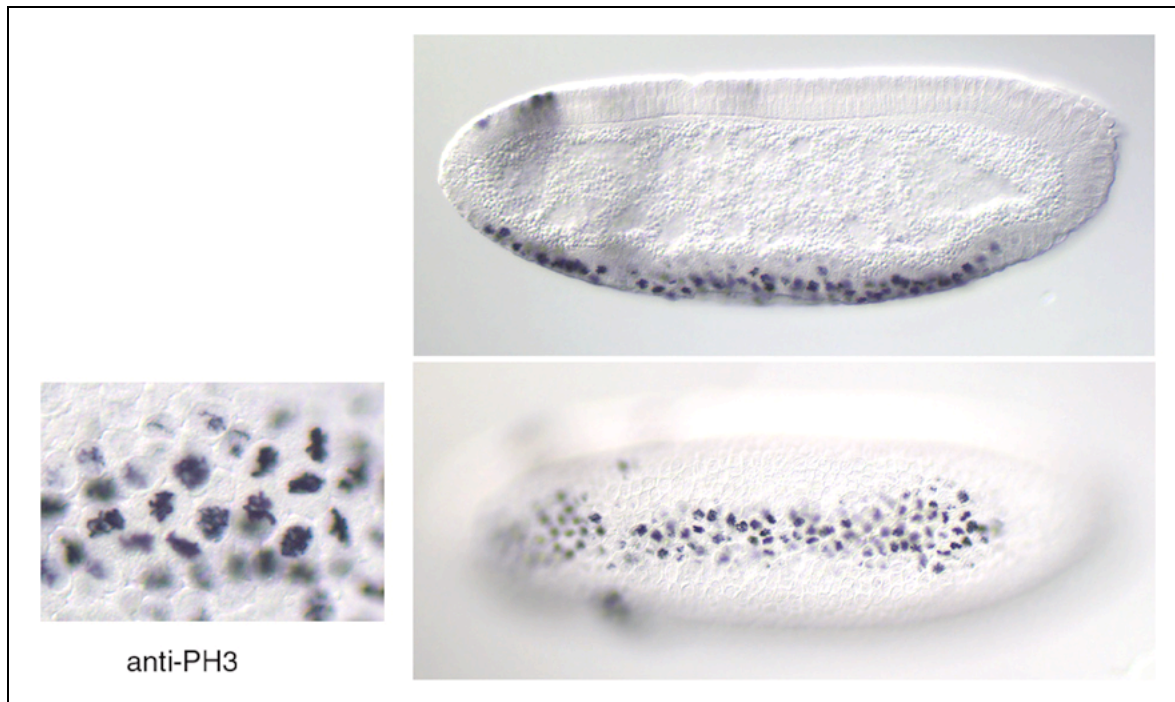


**Abb. 2.43:** Mesodermspezifische Expression von *string* in *twist*-Mutanten. Teilungen werden wieder möglich aber es werden keine frühzeitigen Teilungen ausgelöst.



gehen jedoch auch hier im Vergleich mit Wildtyp-Embryonen oder *tribbles*-Mutanten weniger Zellen in Teilung. Dies liegt vor allem daran, daß sich nur die ventralsten Zellen der Mesodermanlage teilen. Mehr lateral, somit mehr dorsal gelegene Zellen teilen sich nicht. Zusammen mit den Zellen des Mesoderms teilen sich zeitgleich und ebenfalls verfrüht die Zellen von MD8. Die Situation in homozygoten *sna*, 2xPEe-*stg*-Embryonen ähnelt damit sehr der Situation von *tribbles*-Mutanten.

Im Vergleich von *twi*, 2xPEe-*stg*- und *sna*, 2xPEe-*stg*-Embryonen ergab sich somit, daß ein mutanter Phänotyp, wie in *tribbles*-Mutanten, dann gefunden wird, wenn Cdc25<sup>string</sup> in Abwesenheit der Funktion von *snail* im Mesoderm experimentiert wird. In Abwesenheit der Funktion von *twist* und gleichzeitiger Expression von Cdc25<sup>string</sup> war die Teilungskinetik im Mesoderm mit der von Wildtyp-Embryonen vergleichbar. Der

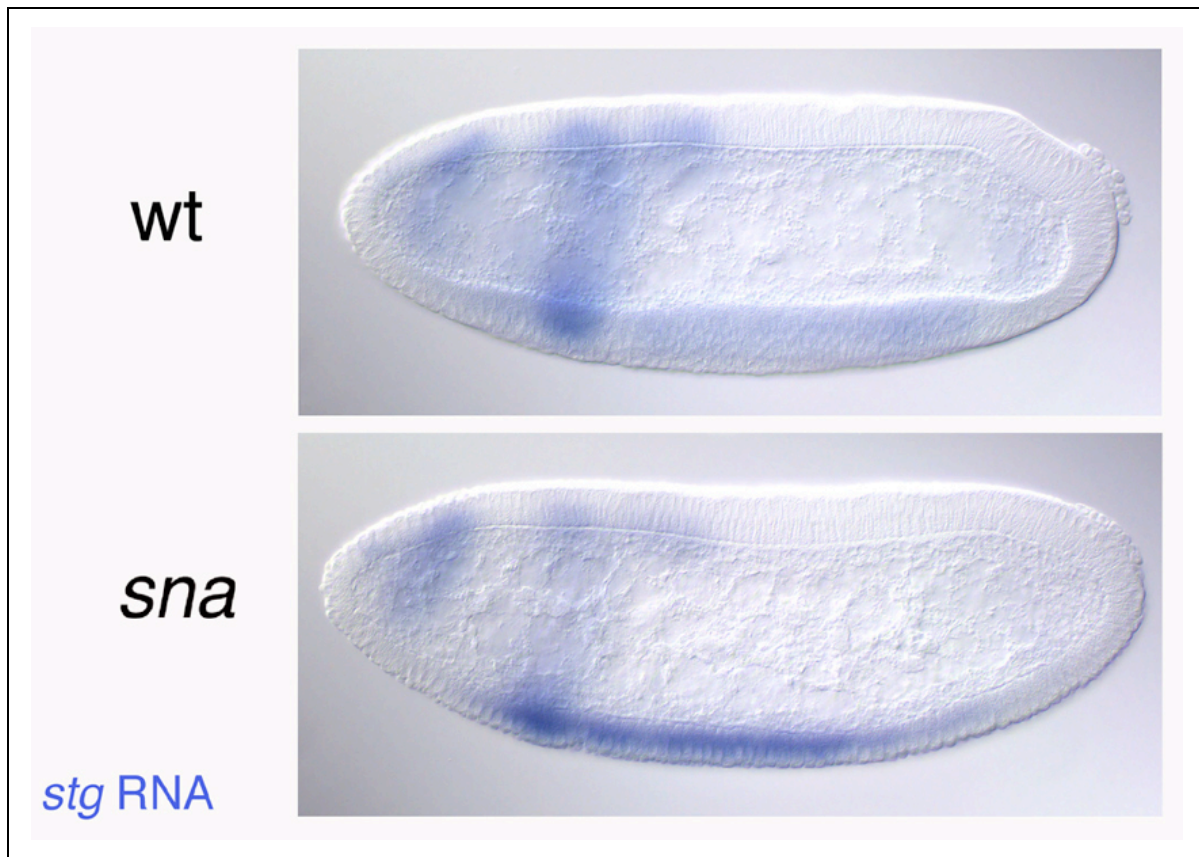


**Abb. 2.44:** Expression von *string* im Mesoderm von *snail*-Mutanten. Es kommt zu frühzeitigen Teilungen.



wesentliche Unterschied der beiden Situationen ist die Abwesenheit von *twist* oder *snail*, und nur im letzteren Fall kommt es zu frühzeitigen Teilung von mesodermalen Zellen.

Die Schlußfolgerung muß daher lauten, daß *snail* und nicht *twist* für die Blockierung der Zellteilungen im Mesoderm notwendig ist. *Twist* ist dagegen der Aktivator von  $Cdc25^{string}$  und somit notwendig für die Auslösung der Teilungen im Mesoderm. Ob *snail* dabei *tribbles* oder den durch *Df(3L)BK10* aufgedeckten Locus oder gar beide kontrolliert, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beurteilt werden. Eine Schwäche des Experiments bestand meiner Meinung nach darin, daß in *snail*-Mutanten *twist* im Bereich der Mesodermanlage exprimiert ist. Es war zwar publiziert, daß sowohl in *twist*- als auch in *snail*-Mutanten die Expression von  $Cdc25^{string}$  im Mesoderm verschwindet (Edgar et al., 1994b), aber da *twist* der Aktivator von  $Cdc25^{string}$  im Mesoderm ist, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß doch noch eine Restmenge an  $Cdc25^{string}$  in *snail*-Mutanten vorhanden ist. Um die  $Cdc25^{string}$ -Expression in beiden Mutanten zu vergleichen, wurden *snail*- und *twist*-Embryonen mit einer DIG-markierten RNA-Sonde von  $Cdc25^{string}$  hybridisiert. Die Färbung ergab, daß *twist*-Mutanten keine  $Cdc25^{string}$ -Expression zeigten, wohingegen in *snail*-Mutanten eine deutliche  $Cdc25^{string}$ -Expression nachweisbar war. Letzteres Ergebnis steht dabei im Widerspruch zu den publizierten Daten. Die Konsequenz ist, daß die  $Cdc25^{string}$ -Expression in *sna*, *2xPEe-stg*- und *twi*, *2xPEe-stg*-Embryonen doch nicht als gleich angesehen werden kann. Ob der Zellzyklusphänotyp in *sna*, *2xPEe-stg*-Embryonen durch die Erhöhung um die in *snail*-Mutanten verbliebene  $Cdc25^{string}$ -Expression verursacht wird, kann anhand der vorliegenden Ergebnissen nicht beurteilt werden. Es ist ebenso möglich, daß *snail* für die Aktivierung von *tribbles* verantwortlich ist und daher in *snail*-Mutanten bereits geringe Mengen an  $Cdc25^{string}$ -Expression zur Auslösung der Teilungen im Mesoderm führen. Es läßt sich jedoch mit einiger Sicherheit sagen, daß *twist* für die Aktivierung von *tribbles* nicht verantwortlich ist, sonst hätte auch hier ein mesodermaler Teilungsdefekt auftreten müssen.



**Abb. 2.45:** Die Expression von string im Mesoderm von snail-Mutanten.

*Nachtrag:*

Der von *Df(3L)BK10* aufgedeckte Locus ist von Jörg Großhans und Eric Wieschaus kartiert und identifiziert worden. Sie nannten das gefundene Gen *frühstart* (*frs*). *frühstart* kodiert für ein kleines Protein, daß bisher keine Homologie zu irgendeinem anderen bekannten Protein zeigt. Die *frühstart*-RNA ist ubiquitär lokalisiert. J.Großhans und E. Wieschaus erzeugten Antikörper gegen Frühstart und Tribbles und konnten zeigen, daß die Proteine in ähnlicher Weise exprimiert sind wie die korrespondierenden mRNAs (J. Großhans, persönl. Mitteilung).

In der Arbeit von Juan Mata et al. wurden funktionelle Studien zur Rolle von Tribbles durchgeführt. Das Besondere ihrer Arbeit ist, daß sie zeigen konnten, daß Tribbles an dem Abbau von Cdc25<sup>string</sup> (und seinem keimbahnspezifischen Homolog Twine) beteiligt ist, und daß Tribbles auch mindestens eine Zellteilung in der Keimbahn während der Oogenese kontrolliert. Allerdings hat Tribbles hier den umgekehrten Effekt im Vergleich zum Mesoderm: Überexpression von *tribbles* führt zu einer Extra-Teilung der Keimbahnzellen, Verlust der Aktivität von Tribbles führt dazu, daß sich die Zellen einmal weniger teilen (Mata et al., 2000).

In einer weiteren Arbeit konnten Pernille Rørth et al. nachweisen, daß Tribbles vermutlich auch am Abbau eines weiteren Proteins, des Transkriptionsfaktors Slobo, beteiligt ist und direkt an Slobo binden kann. Ein Effekt auf Zellteilungen wurden in diesem Zusammenhang nicht festgestellt. Fehlt die Aktivität von *tribbles*, kommt es während der Oogenese zu Defekten bei der Wanderung der *border cells* (Rorth et al., 2000).

### 3. Diskussion

Die Frage nach den morphogenetischen Prozessen, die im Verlauf der Ontogenese den Körperplan (“body plan”) realisieren, ist ein wichtiges Thema innerhalb der Entwicklungsbiologie. Eine der eindrucksvollsten Etappen auf diesem Weg ist die Gastrulation. Die hier vorgelegte Arbeit versucht die Rollen bekannter und neu identifizierter Gene bei der Kontrolle der Ventralfurcbenbildung in *Drosophila* zu beschreiben. Ziel der Arbeit war es, bisher unbekannte an der Ventralfurcbenbildung beteiligte Loci zu identifizieren und neue Erkenntnisse über das genetische Kontrollsystem zu gewinnen, das die Prozesse steuert, die zur Invagination des Mesoderms im Embryo von *Drosophila* führen. Die verschiedenen in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellungen werden getrennt diskutiert.

#### 3.1 Ergebnisse des Defizienzen-Screens

##### 3.1.1 Phänotypischer Screen und Beurteilung der Test-Methode

Im Verlauf des von mir durchgeführten Defizienzen-Screens wurde im autosomalen Genom von *Drosophila* mit rund 200 Stämmen, die definierte Deletionen tragen, nach Regionen gesucht, die für eine normale Ventralfurcbenbildung notwendig sind. Ausgehend von den mutanten Phänotypen, die man in hemizygoten *folded gastrulation*-Mutanten oder Embryonen heterozygot für eine Nullmutation in *snail* findet, wurde ein phänotypischer Screen durchgeführt, der schwache und nur vorübergehend bestehende Störungen der Ventralfurcbenbildung identifizieren sollte. Ob es weitere Gene geben würde, deren Ausfall zu ähnlichen Phänotypen wie etwa in *folded gastrulation*-Mutanten führt, war vorher nicht klar. Die Identifizierung von vier Regionen, deren Verlust zu vorübergehenden Defekten bei der Invagination des Mesoderms führt, zeigte, daß es möglich war, solche mutanten Phänotypen zu finden. Es bewies auch, daß das phänotypische Kriterium so gewählt war, daß subtile Defekte bei der Invagination des Mesoderms damit erkannt werden konnten. In allen vier Fällen trat

der Defekt meist nur vorübergehend auf und das Mesoderm gelangte in allen Mutanten in das Innere des Embryos und entsprach damit der Art von Phänotyp, wie sie in hemizygoten *folded gastrulation*- oder heterozygoten *snail*-Embryonen beobachtet wird. Ein vergleichbarer phänotypischer Screen, um für die Ventralfurchenbildung notwendige Gene zu identifizieren, war vorher nicht durchgeführt worden. Eric Wieschaus und Mitarbeiter führten in ihrem Labor jedoch etwa zeitgleich einen ähnlichen phänotypischen Screen durch, in dessen Verlauf auch nach Lokussen gesucht wurde, die für eine normale Ventralfurchenbildung notwendig sind. In diesem Screen wurden keine Stämme mit Deletionen, sondern eine spezielle Sammlung von Stämmen mit Translokationen und Transpositionen verwendet. Der Vorteil dieses Screens besteht in der Minimierung des Aufwands der phänotypischen Analyse. In der ersten Phase müssen nur rund 30 Kreuzungen durchgeführt werden. Außerdem erreicht der "Translokations-Screen" ein hohes Maß an Abdeckung: Mit den verwendeten Stämmen können etwa 98% des autosomalen Genoms untersucht werden. Der Nachteil besteht in der groben Kartierung, was mehr Aufwand bei der Feinkartierung eines identifizierten Locus bedeutet. Die Ergebnisse ihres Screens müssen meinem Ansatz gegenübergestellt werden, weil sie einerseits eine Art Positivkontrolle darstellen und andererseits dazu beitragen, den genetischen Ansatz insgesamt besser bewerten zu können (s.u.). Als Positivkontrolle bestätigte der Screen von Eric Wieschaus und Mitarbeitern die in meinem Screen erzielten Ergebnisse. Sie deckten sich sogar genau mit meinen Ergebnissen. In ihrem Screen wurden - nach einer feineren Kartierung unter Zuhilfenahme von Deletionen - die gleichen vier Regionen identifiziert.

### **3.1.2 Bewertung des Defizienzen-Screens**

Der Ansatz, das Genom mit Hilfe von Defizienzen nach embryonalen Phänotypen zu durchmustern wurde von Poulson entwickelt (Poulson, 1937). Mit einem Defizienzen-Screen läßt sich ein großer Teil des Genoms relativ schnell auf zygotische Genfunktionen untersuchen (Ashton et al., 2001; Campos-Ortega and Jimenez, 1980; Smith et al., 1993). Gene, die nur zygotisch exprimiert sind, werden in einem Defizienzen-Screen völlig

ausgeschaltet. Sie werden somit immer als Nullmutationen untersucht, wohingegen in einer EMS-Mutagenese verschiedene, auch hypomorphe Allele erzeugt werden können. Der Nachteil eines Defizienzen-Screens kann darin liegen, daß zu viele Gene gleichzeitig deletiert werden. Dies kann zu Problemem bei der Analyse führen, beispielsweise dann, wenn Prozesse betroffen sind, die dem eigentlich interessierenden vorausgehen, diesen aber indirekt beeinflussen. Solche sekundären Effekte werden umso wahrscheinlicher, je weiter die Aktivierung des zygotischen Genoms vor dem interessierenden Prozess liegt. Für die in der vorgelegten Arbeit untersuchten Prozesse während der Gastrulation bestand diese Gefahr kaum. Das zygotische Genom wird erst kurz vor der Gastrulation, während der Zellularisierung, aktiviert. Sekundäre Effekte mußten daher nicht erwartet werden, konnten aber auch nicht gänzlich von vornherein ausgeschlossen werden. Dies gilt insbesondere für maternal exprimierte Gene. Da die Eier in einem Defizienzen-Screen in der Regel von heterozygot defizienten Müttern abgelegt werden, ist es denkbar, daß durch die Deletion die Expression eines maternalen Faktors reduziert wird, was in den Embryonen dann möglicherweise zu einer genetischen Interaktion mit einem gleichzeitig deletierten zygotischen Faktor führen könnte. Ein solcher Fall liegt vermutlich dem mutanten Phänotyp der Defizienz *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* zugrunde.

### 3.1.3 Die Abdeckung des Genoms durch den Defizienzen-Screen

Die Abdeckung des Genoms durch die Summe der im Defizienzen-Screen verwendeten Deletionen liegt bei etwa 80%. Dies ist zwar für einen Defizienzen-Screen eine relativ gute Abdeckung, aber im Vergleich zu einer sättigenden Mutagenese auch deutlich weniger. Die Wahrscheinlichkeit, einen wichtigen Locus zu verpassen, liegt somit theoretisch bei 1:5. Der Vergleich mit den Ergebnissen des Translokations-Screens von E. Wieschaus und Mitarbeitern, der eine Abdeckung von 98% erreichte, zeigte jedoch, daß die gleichen vier Regionen des Genoms identifiziert wurden. Der Bereich, der weder mit Defizienzen noch mit Translokationen zugänglich war, liegt vor allem an der Basis des dritten Chromosoms und dort vor allem im Bereich der Basis des rechten Arms. Es ist nicht auszuschließen, daß sich in diesen Regionen weitere Loci befinden,

die für die Ventralfurchenbildung von Bedeutung sind. Diese Regionen sind jedoch genetisch nur schwer zugänglich. Zwei weitere Regionen bedürfen ebenfalls einer gezielten Untersuchung. Dies sind die unmittelbaren Umgebungen der Gene *snail* und *twist*. Diese können mit Defizienzen nur näherungsweise untersucht werden. Bei Deletionen, die *snail* oder *twist* herausnehmen, muß damit gerechnet werden, daß deren mutante Phänotypen Effekte, die durch die Deletion anderer Loci entstehen könnten, überdecken. Ein für die Ventralfurchenbildung relevantes Gen in direkter Nachbarschaft von *snail* oder *twist* wäre mit den erhältlichen Defizienzen nicht identifizierbar, da mit ihnen die nächste Umgebung von *snail* oder *twist* nicht erreicht wird. Geht man davon aus, daß ein für die Invagination des Mesoderms notwendiger Locus in direkter Nachbarschaft von *snail* oder *twist* liegen würde, dann läßt sich zumindest folgendes Gedankenexperiment machen:

Angenommen ein unbekannter Locus, der für die Invagination des Mesoderms notwendig ist, läge in der Nachbarschaft von *twist*. Ich nenne ihn *xy*. Eine Deletion der ganzen Region - weitere für die Ventralfurchenbildung relevante Gene seien dort nicht vorhanden - würde in Bezug auf die Ventralfurchenbildung formal eine *twist, xy*-Doppelmutante erzeugen. In homozygoten *twist, xy*-Mutanten findet die Gastrulation wegen des Verlustes der Aktivität von *twist* nicht statt. *xy* würde daher vermutlich unentdeckt bleiben, denn *twist* würde sich epistatisch zu *xy* verhalten. In heterozygoten *twist*-Mutanten ist kein mutanter Phänotyp nachweisbar. In heterozygoten *twist, xy*-Mutanten wäre jedoch ein Phänotyp vorstellbar, wenn hier eine genetische Interaktion stattfände. Wäre dies so, dann müßte man einen phänotypischen Unterschied sehen, wenn man heterozygot mutante Embryonen von Stämmen mit amorphen *twist*-Allelen oder minimalen *twist*-Defizienzen (*twi*<sup>EY53</sup>) mit solchen, die größere *twist*-Defizienzen tragen, vergleicht. Solche Effekte sind aber nie beobachtet worden. Wenn also ein wichtiger Locus in der Nachbarschaft von *twist* liegt, so zeigt dieser zumindest keine offensichtliche genetische Interaktion mit *twist*.

Ähnliches gilt für die *snail*-Region. *snail*-Defizienzen verschiedener Größe lassen keine auffälligen phänotypischen Differenzen der jeweiligen heterozygot mutanten Embryonen erkennen. Allerdings wurde gezeigt (Kap. 2.2), daß mit Hilfe eines mesodermspezifischen *snail*-Transgens die Deletion von *snail* in *Df(2L)osp29* völlig

kompensiert werden konnte. Daher ist nicht anzunehmen, daß in der Region, die durch *Df(2L)osp29* deletiert wird, weitere Loci zu finden sind, deren alleinige Deletion zu einem Defekt bei der Ventralfurchenbildung führen würde. Eine vollständige Analyse der gesamten *snail*-Region steht allerdings noch aus.

Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse des Translokations-Screens von E. Wieschaus und Mitarbeitern hat der Defizienzen-Screen eine gute Abdeckung der momentan genetisch zugänglichen Bereiche des Genoms von *Drosophila* erzielt. Gerade der Vergleich mit dem Translokations-Screen gibt Anlass zu der Annahme, daß der Defizienzen-Screen alle Regionen identifiziert hat, die mit dem gewählten phänotypischen Kriterium auffindbar und mit den derzeitigen genetischen Methoden zugänglich waren. Fünf Regionen bedürfen einer weiteren Analyse: die proximalen Bereiche der Chromosomenarme 3L und 3R, das vierte Chromosom, daß zwar klein aber nur unzureichend mit Deletionen zugänglich ist, sowie die unmittelbare Nachbarschaft der Gene *snail* und *twist*.

### 3.1.4 Bewertung der identifizierten Mutanten und ihrer Phänotypen

#### 3.1.4.1 Überblick

In dem hier vorgestellten Defizienzen-Screen wurden vier Regionen identifiziert, die für eine normale Invagination des Mesoderms notwendig sind. Diese werden durch die Defizienzen *Df(2L)ed dp*, *Df(3L)BK10*, *Df(3L)ri79c* und *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>*, sowie *D(3R)Tl<sup>P</sup>* repräsentiert. Die mutanten Phänotypen dieser Deletionen haben gemeinsame Charakteristiken: Allen vier ist gemein, daß die Invagination des Mesoderms nur vorübergehend gestört ist und letztendlich vollendet wird. Es lassen sich jedoch auch Unterschiede der morphologischen Defekte beschreiben.

Bei *Df(3L)BK10* und *Df(3L)ri79c* bzw. *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* führen Zellteilungen zu den beschriebenen Defekten (s.u. und Kap. 2.4). Die Konsequenz ist, daß die Zellen Formen annehmen, die sich von den während der Gastrulation normalerweise sichtbaren Zellformen grundsätzlich unterscheiden (s. Kap. 2.4) und somit eine normale



Invagination verhindern. Die Zellen runden sich ab und sind nach der Teilung auch kleiner als normale Zellen des mesodermalen Primordiums.

Bei *Df(3R)Tl<sup>P</sup>* ist die Mesodermanlage geschmälert, weil ihre Ausdehnung nach dorsal geringer ist. Die in diesen Mutanten gefundene Ventralfurche bildet sich mit Verzögerung und zeigt eine geringere Invaginationstiefe. Die normalen Zellformänderungen können zwar beobachtet werden, aber die Invagination geschieht unkoordinierter als in Wildtyp-Embryonen.

Bei *Df(2L)ed dp* invaginiert das Mesoderm ebenfalls verzögert. Hier ist auffällig, daß die normalen Zellformänderungen nur partiell abnorm sind. Es kommt zwar zu apikalen Konstriktionen, aber die Zellen flachen ihre apikalen Oberflächen nicht so ab, wie man es in Wildtyp-Embryonen beobachten kann.

Der Vergleich der verschiedenen Morphologien läßt vermuten, daß in jeder dieser Mutanten ein unterschiedlicher Aspekt der Ventralfurchenbildung defekt ist. Keiner der beschriebenen Defekte ist so schwerwiegend, daß die Invagination des Mesoderms komplett ausbleibt. Diese Situation änderte sich auch dann nicht, wenn alle sechs Kombinationen möglicher Doppeldeletionen (*tribbles* wurde nur durch *Df(3L)ri79c* repräsentiert) erzeugt wurden. In keiner der Doppelmutanten war eine gravierende Verstärkung gegenüber den Phänotypen der jeweiligen Einzeldefizienzen nachweisbar. Wenn in den verschiedenen Defizienzen tatsächlich verschiedene, womöglich unabhängige Teilprozesse betroffen sind (*tribbles* und *frühstart* sollen hier als Teil *eines* Mechanismus betrachtet werden), dann bedeutet dies, daß auch der gleichzeitige Ausfall von zwei Teilprozessen während der Gastrulation immer noch kompensiert werden kann, zumindest derjenigen, die in den untersuchten Defizienzen möglicherweise betroffen sind. In der Kombination von *Df(3L)BK10* und *Df(3L)ri79c* bzw. *Df(3L)rdgC<sup>co2</sup>* mit einer der beiden anderen Defizienzen kommt es jeweils zur Verbindung von verfrühten Zellteilungen, die alleine schon die Invagination des Mesoderms stark behindern, mit einem bisher nicht näher charakterisierten morphogenetischen Defekt, und dennoch gelangen alle mesodermalen Zellen ins Innere des Embryos. Die im Mesoderm verbliebene Fähigkeit zur Invagination reicht immer noch aus, um die Vollendung der Invagination sicherzustellen.

Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Einerseits ist es denkbar, daß die Redundanz des die Invagination steuernden Systems größer ist als vielleicht bisher vermutet. Dann muß man davon ausgehen, daß es weitere bislang unidentifizierte Faktoren gibt, die auch bei Wegfall der hier beschriebenen Loci oder bei Wegfall von *folded gastrulation* in der Lage sind, die Ventralfurchenbildung alleine zu steuern. Andererseits ist es nicht klar, auf welcher Kontroll-Ebene die neu gefundenen Loci überhaupt eingreifen (Man könnte es so formulieren: Es gibt eine oberste Kontrollebene, gebildet von *snail* und *twist*, und es gibt eine Ebene der Effektorproteine, zu denen vermutlich Aktin und cMyosin gehören; wieviele Schritte oder Ebenen dazwischen liegen, ist ungeklärt und bedarf der Identifizierung weiterer Faktoren, die an der Kontrolle der Ventralfurchenbildung beteiligt sind). Wurden mit den vier Defizienzen Effektor-Gene gefunden, oder Gene, deren Produkte die Aktivität anderer Gene kontrollieren? Im Fall von *tribbles* und *frühstart* ist noch nicht genau aufgeklärt, worin die biochemische Aktivität der Genprodukte besteht. Zumindest für *tribbles* wurde jedoch gezeigt, daß durch seine Aktivität das Protein Cdc25<sup>string</sup> abgebaut werden kann (Mata et al., 2000). Damit greift *tribbles* in die Kontrolle eines zellbiologischen Prozesses (Zellzykluskontrolle) ein und reguliert vermutlich direkt keine anderen Gene. (Theoretisch könnte der Effekt von *tribbles* aber so indirekt sein, daß auch die Kontrolle anderer Gene durch *tribbles* nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Der Abbau von *slbo* zeigt, daß *tribbles* möglicherweise indirekt auch an der Kontrolle der Aktivität von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Rorth et al., 2000)). Der Effekt von *frühstart* auf die Stabilität oder den Abbau von Cdc25<sup>string</sup> ist bisher nicht untersucht worden. Eine weitere Diskussion der Ergebnisse zu *tribbles* und *frühstart* wird in Kap. 3.4 gegeben.

Auf welcher Ebene der durch die Defizienz *D(3R)Tl<sup>P</sup>* aufgedeckte Locus agieren könnte, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

*Df(2L)ed dp* wurde nicht weiter untersucht. Die Tatsache, daß in diesen Mutanten keine Abflachung der Zelloberflächen stattfindet, hat diese Mutation mit *twist*-Mutanten gemeinsam. Ob es sich hier jedoch um ein Zielgen von *twist* handelt, ist unklar.

#### 3.1.4.1 Der von *D(3R)Tl<sup>P</sup>* aufgedeckte Locus ist wahrscheinlich *t48*

In Doppelmutanten, in denen je eine der Defizienzen mit einem amorphen Allel von *folded gastrulation* ( $\text{fog}^{4a6}$ ) kombiniert wurde, konnte nur bei  $D(3R)Tl^P$  eine Interaktion festgestellt werden. In diesem Fall konnte eine erhebliche Verstärkung beobachtet werden, wenn  $D(3R)Tl^P$  homozygot und gleichzeitig *folded gastrulation* heterozygot mutant war. Der resultierende Phänotyp zeigte eine Verdrillung und tiefe Einfaltungen der Embryonen und selbst bei fortgeschrittener Keimstreifausstreckung war ein Teil der mesodermalen Zellen noch außerhalb des Embryos. Dieser Phänotyp war stärker als alle in den Defizienzen gefundenen Defekte und auch stärker als der mesodermale Anteil des Phänotyps von hemizygoten *folded gastrulation*-Mutanten. Der Defekt konnte in dieser Situation nicht mehr vollständig kompensiert werden. Teile des Mesoderms invaginierten, andere Teile des Mesoderms verblieben auf der Außenseite. Die Reproduktion dieses Phänotyps in Doppelmutanten für *folded gastrulation* und *t48* zeigte auf, welches Gen höchstwahrscheinlich für diese starke Interaktion verantwortlich war. Embryonen, die homozygot mutant nur für *t48* sind, zeigen keinerlei Defekte und sind lebensfähig. Die Sequenz von *t48* legt nahe, daß es sich um ein membranständiges Protein handelt. Weitere mögliche Funktionen können aus der Proteinsequenz nicht geschlossen werden. Eine begründete Erklärung für die Interaktion von *t48* und *folded gastrulation* kann bisher nicht gegeben werden. Daß es sich bei *t48* um den postulierten Rezeptor für *folded gastrulation* handelt, kann ausgeschlossen werden, weil *t48*-Mutanten keine Defekte während der Gastrulation zeigen (ebensowenig in anderen untersuchten Prozessen).

### **Ein spekulatives Modell zur Funktion von *t48***

Eine rein spekulative, aber denkbare Erklärung für die Rolle von *t48* soll im folgenden diskutiert werden:

Theoretisch könnte es sein, daß *t48* ein membrangebundenes Protein ist, das mit dem postulierten *folded gastrulation*-Rezeptor in der Membran interagiert. Eine mögliche Folge wäre, daß der *folded gastrulation*-Rezeptor wie auch *t48* durch die

Interaktion aktiviert wird und Signale ins Innere der Zelle abgibt, die unterhalb gelegene Faktoren aktivieren (z.B.: *concertina*), die dann die Zellformänderungen bewirken. Dadurch wäre eine basale Aktivität des *folded gastrulation*-Rezeptors gegeben. *t48*-Mutanten zeigen keine sichtbaren Defekte. Es kann daher nicht angenommen werden, daß die Interaktion von *t48* mit dem *folded gastrulation*-Rezeptor eine notwendige Interaktion ist. Die Bindung von *folded gastrulation* an den *folded gastrulation*-Rezeptor würde dessen Aktivität erhöhen und dazu führen, daß die Zellformänderungen beschleunigt und synchronisiert werden.

Mit diesen Annahmen lassen sich die meisten Ergebnisse aus der Analyse von Mutanten und genetischen Interaktionen plausibel erklären:

In *folded gastrulation*-Mutanten wäre im Mesoderm die basale Aktivität von *folded gastrulation*-Rezeptor und *t48* ausreichend um - wenn auch verlangsamt und unkoordiniert - Zellformänderungen zu bewirken und die Invagination des Mesoderms sicherzustellen.

In der posterioren Mitteldarmanlage ist *t48* nicht exprimiert. In *folded gastrulation*-Mutanten würde im posterioren Mitteldarmprimordium deshalb die Aktivierung des *folded gastrulation*-Rezeptors ausbleiben, und nicht einmal die basale Aktivität des *folded gastrulation*-Rezeptors wäre vorhanden. Dies würde erklären, warum der mutante Phänotyp von *folded gastrulation*-Mutanten im Bereich der Mitteldarmanlage erheblich stärker ausfällt als in der Mesodermanlage. Im Wildtyp würde alleine die starke Expression von *folded gastrulation* im Bereich der Mitteldarmanlage die Aktivierung des *folded gastrulation*-Rezeptors und damit die Zellformänderungen auslösen. Die Konsequenz ist, daß der alleinige Verlust der Aktivität von *folded gastrulation* dazu führt, daß keine Mitteldarminvagination stattfindet.

In Mutanten für *t48* reicht - ähnlich wie in der Mitteldarmanlage von Wildtypen - die Expression von *folded gastrulation* alleine aus, um den *folded gastrulation*-Rezeptor zu aktivieren, was zur Bildung der Ventralfurche führt. Dies würde erklären, warum *t48* für die Ventralfurchenbildung verzichtbar ist.

Reduziert man in *t48*-Mutanten aber zusätzlich die Aktivität von *fog*, dann kommt es zu den beobachteten schweren Defekten. Dies ist auch in Einklang mit der Beobachtung, daß in Embryonen die heterozygot für ein amorphes Allel von *folded gastrulation* sind

(fog<sup>4a6</sup>), leichte Defekte bei der Invagination des Mesoderms beobachtet werden können (T. Seher, Diplomarbeit, Köln 1996).

Dieses spekulative Modell würde die meisten Ergebnisse erklären, die *t48* und vor allem die Interaktion zwischen *t48* und *folded gastrulation* betreffen. Außerdem wäre das Modell im Einklang mit dem Phänotyp von *twist*-Mutanten. In diesen fehlt sowohl die Expression von *folded gastrulation* als auch von *t48*. Das Modell könnte, wenn die gemachten Annahmen so oder in ähnlicher Weise zuträfen, dann möglicherweise auch den *twist*-Phänotyp besser erklären.

Schließlich könnte das Modell auch den Phänotyp von *D(3R)Tl<sup>P</sup>* und vor allem dessen Differenz zu *t48*-Mutanten erklären. In *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Mutanten sind neben *t48* unter anderem auch *Toll* und *spätzle* deletiert. Die beiden letzteren Gene sind maternal exprimiert. Die Embryonen werden von heterozygot defizienten Müttern produziert, die Gendosis für *Toll* und *spätzle* ist in den entstehenden Embryonen daher um die Hälfte reduziert. Während eine Halbierung der Gendosis von *Toll* normalerweise keine Effekte zeigt, führt die Reduktion der Dosis von *spätzle* zu einer Verkleinerung der *twist*-Domäne. Mesoderm entsteht dort, wo *spätzle* an den *Toll*-Rezeptor bindet und die Signalkaskade aktiviert, die schließlich zum Kernimport von *dorsal* führt. Eine Reduzierung der Dosis von *spätzle* führt zu einer Verkleinerung des Bereichs, in dem *Toll* aktiviert wird und letztendlich zu einer verkleinerten Mesodermanlage. Embryonen, die von *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Müttern stammen, haben nur die halbe Dosis an *spätzle* und daher auch eine verkleinerte Mesodermanlage. Eine Erklärung, dafür, daß in diesen Embryonen auch ein Ventralfurchendefekt auftritt, könnte so aussehen: Die Reduzierung von *spätzle* führt nicht nur zu einer verkleinerten *twist*-Domäne, sondern auch zu einer Verringerung der Dosis von *twist*. (Möglicherweise spielt die zusätzlich zu *spätzle* ebenfalls halbierte Gendosis von *Toll* dabei auch eine Rolle, obwohl *Toll*-Defizienzen, die *spätzle* nicht mit herausnehmen, eine normal breite Mesodermanlage haben). Wäre dies so, dann würden auch die Zielgene von *twist* möglicherweise in ihrer Expression reduziert, und damit auch *folded gastrulation* und *snail* (wenn auch nicht zwangsläufig um die Hälfte, wie der Vergleich von *twist*- und *snail*-Heterozygoten zeigt). In der Konsequenz würde dies bedeuten, daß in homozygoten *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Embryonen die Aktivität von *t48* völlig fehlt und die von *folded gastrulation* (und *snail* ?) möglicherweise reduziert ist. Würde das

oben formulierte Modell zutreffen, dann würde dies bedeuten, daß der *folded gastrulation*-Rezeptor nur unzureichend aktiviert wird. Eine noch stärkere Reduzierung der Aktivität von *folded gastrulation* würde dann in dem Phänotyp resultieren, den man in Embryonen des Genotyps *fog/+; t48/t48* findet. Inwieweit die Expression von *folded gastrulation* in homozygoten *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Embryonen tatsächlich reduziert ist, ist bisher nicht untersucht. Da eine Reduzierung der *snail*-Aktivität um die Hälfte bereits Effekte zeigt, könnte auch *snail* zu dem beobachteten Phänotyp beitragen.

Das Modell, das hier dargelegt wurde, ist ein spekulatives. Es ist aber in der Lage, alle Ergebnisse, die *t48* und *folded gastrulation* betreffen, miteinander in Einklang zu bringen: die verschiedenen Mutanten und deren Phänotypen, die Interaktion zwischen *folded gastrulation* und *t48*, die unterschiedlichen Phänotypen in *folded gastrulation*-Mutanten in Mitteldarm- und Mesodermanlage und auch den mutanten Phänotyp von *D(3R)Tl<sup>P</sup>*. Es könnte daher als Arbeitshypothese für weitere Experimente dienen. Da die Idee zu diesem Modell erst in den letzten Tagen der vorgelegten Arbeit entstand, konnte es nicht mehr getestet werden. Um es zu testen, schlage ich die folgenden Experimente vor:

1) Wenn das Modell zutrifft, dann besteht in Bezug auf die genetische Kontrolle der Invaginationen von Mesoderm und posteriorer Mitteldarmanlage der entscheidende Unterschied darin, daß im Mesoderm *t48* exprimiert ist und in der Mitteldarmanlage nicht. Wäre dies so, dann müßte ein Konstrukt, durch das *t48* spezifisch im Bereich der Mitteldarmanlage exprimiert werden kann, in der Lage sein, den Mitteldarmphänotypen von *folded gastrulation*-Mutanten zu retten, weil dann dort eine vergleichbare Situation wie im Mesoderm bestehen würde. Eine Möglichkeit wäre die Expression von *t48* unter Kontrolle des *huckebein*-Promotors (*hkb-t48*).

2) Bei der Interaktion von *t48* mit *folded gastrulation* wurde ein schwerer Gastrulationsdefekt beobachtet. Dieser konnte jedoch nur in Embryonen untersucht werden, deren Genotyp *fog/+; t48* war. Embryonen, deren Genotyp *fog/Y; t48* war, konnten nicht analysiert werden, weil der Mitteldarmphänotyp die Morphologie der Embryonen so stark stört, daß eine genauere Analyse des Verhaltens der mesodermalen Zellen unmöglich war. Da der Mitteldarmphänotyp von *fog*-Mutanten durch ein *hkb-fog*-Konstrukt gerettet werden kann, müßte ein Einkreuzen dieses Transgens in die *fog;t48*

Doppelmutanten (*fog*; *hkb-fog*; *t48*) helfen können, dieses Problem zu umgehen und die Interaktion von *fog* und *t48* im Mesoderm genauer zu untersuchen.

3) Wenn die postulierte Interaktion von *t48* mit dem bisher nicht identifizierten *folded gastrulation*-Rezeptor und dessen angenommene partielle Aktivierung der Grund dafür ist, daß das Mesoderm in *folded gastrulation*-Mutanten invaginiert, dann müßte die ubiquitäre oder lokale Überexpression von *t48* zu nachweisbaren Zellformänderungen führen. Dies könnte mit einem UAS-*t48* Konstrukt getestet werden.

4) Das Modell eröffnet die Möglichkeit, daß der Verlust der Expression von *t48* in *twist*-Mutanten mit für den *twist*-Phänotyp verantwortlich sein könnte. Eine mögliche Überlegung, die man dazu anstellen kann, ist die Annahme, daß der *twist*-Phänotyp die Summe der Einzelmutationen (mindestens) von *snail*, *folded gastrulation* und *t48* ist. Analog zu den Experimenten, die in Kapitel 2.2 vorgestellt wurden, sollte versucht werden, den *twist*-Phänotyp durch die simultane Expression von Transgenen zu retten: *twist*, PE-*fog*; 2xPE-*snail*, 2xPE-*t48*. Weitere Experimente würden sich durch Kombination der verschiedenen Transgene anschließen.

5) Um zu testen, ob der Phänotyp von *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Mutanten tatsächlich darauf beruht, daß die Gendosis von *spätzle* zu einer Reduktion der Dosis von *twist* (und damit indirekt zu einer Reduzierung von *folded gastrulation*) führt, kann man die homozygoten *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Embryonen mit Embryonen des Genotyps *twist/+*; *t48* vergleichen. Trifft die Annahme zu, sollte man in beiden genetischen Situationen ähnliche Defekte erwarten. Außerdem müßte sich der mutante Phänotyp von homozygoten *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Embryonen retten lassen, indem man in diesen *fog* und natürlich *t48* selbst überexprimiert.

### 3.1.5 Gesamtbeurteilung des Defizienzen-Screens und des gewählten Ansatzes

Der hier vorgestellte phänotypische Screen hatte zum Ziel, neue an der Ventralfurchenbildung beteiligte Loci zu identifizieren. Ziel war es weiter, durch die Auffindung von neuen Faktoren, die für die normale Invagination des Mesoderms notwendig sind, wichtige Zielgene von *snail* und *twist* zu identifizieren, um die

genetischen Mechanismen, die die Ventralfurchenbildung steuern, weiter aufzuklären. Beides ist prinzipiell gelungen. Vier Loci wurden identifiziert. Wahrscheinlich bei dreien der vier Loci wurden die aufgedeckten Gene identifiziert (*frühstart* von J. Großhans und E. Wieschaus, *tribbles* von J. Großhans und E. Wieschaus, J.Mata et al. und T.S. u. M.L., *t48* von T.S. und M.L.), deren Ausfall für die mutanten Phänotypen verantwortlich ist. Mit *tribbles* und *frühstart* wurden zwei Gene identifiziert, die einen bisher unbekannten Mechanismus kontrollieren, der das morphogenetische und das mitotische Programm zu Beginn der Gastrulation koordiniert. Dadurch wird sichergestellt, daß die Morphogenese, im besonderen die Invagination des Mesoderms ungehindert stattfinden kann. Eine Einordnung von *t48* in das genetische Netzwerk und eine Beurteilung seiner Funktion kann zu diesem Zeitpunkt nicht vorgenommen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß *t48*, obwohl es sich um einen verzichtbaren Faktor in der Entwicklung des Fliegenembryos handelt, eine wichtige Rolle innerhalb eines redundanten Kontrollsystems spielt. Der vierte Locus, der durch *Df(2L)ed dp* aufgedeckt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Er wird seit kurzem im Rahmen einer Doktorarbeit weiter untersucht (Sam Mathews und Maria Leptin).

Der Defizienzen-Screen hat mit Sicherheit nicht alle für die Ventralfurchenbildung relevanten Loci identifiziert. *tribbles* und *frühstart* repräsentieren zwar einen neuen Mechanismus, der eine wichtige Funktion für die Invagination des Mesoderms darstellt, aber es handelt sich dabei um einen permissiven Mechanismus und nicht um einen instruktiven. Man kann daraus lernen, wie fein verschiedenartige zelluläre Mechanismen aufeinander abgestimmt werden müssen, damit sich ein Embryo ohne Störungen entwickeln kann. Wie jedoch eine Zelle, die Teil eines Epithels ist, durch die gezielte Aktivität von Molekülen dazu gebracht wird, ihre Form so zu ändern, daß sie zusammen mit ihren Nachbarzellen in das Innere des Embryos invaginieren kann, lernt man daraus nicht. Das Beispiel *t48* lehrt, daß, nur, weil die Mutation eines Gens keinen sichtbaren mutanten Phänotyp produziert, dies noch lange nicht bedeuten muß, daß dieses Gen keine wichtige Rolle spielt. *t48* war bekannt, kloniert und teilweise charakterisiert, aber es konnte keine Funktion nachgewiesen werden. Dies könnte sich nun ändern. Meiner Ansicht nach könnte die Aufklärung der Funktion von *t48* neue Einsichten nicht nur in die Kontrolle der Ventralfurchenbildung bringen. Das Beispiel



*t48* hat für die Beurteilung des Defizienzen-Screens auch noch eine andere Bedeutung. Hätte die vermutliche Interaktion mit *spätzle* nicht dazu geführt, daß die homozygot mutanten *D(3R)Tl<sup>P</sup>*-Embryonen einen Ventralfurchendefekt zeigten, wäre *t48* in diesem Screen nicht identifiziert worden. Seine Entdeckung war gewissermaßen ein Zufall (Daß die Interaktionsexperimente von mesodermal exprimierten Genen mit *folded gastrulation* erst das Augenmerk auf *t48* lenkten, sei hier vernachlässigt). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß es weitere bisher unidentifizierte Gene gibt, die trotz Mutation keine offensichtlichen mutanten Phänotypen produzieren und lebensfähig sind, aber für die Invagination des Mesoderms eine wichtige Rolle spielen. Derartige Gene konnten mit der gewählten Testmethode nicht identifiziert werden. Somit haben die Erkenntnisse, die aus dem Defizienzen-Screen hervorgehen, auch Einfluß auf die Planung und Gestaltung eines möglichen zukünftigen Screens, der die noch fehlenden Gene identifizieren soll.

### 3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von *twist*

Im ersten Teil der vorgelegten Arbeit war es das Ziel, durch die Ausschaltung von Genaktivität, neue an der Ventralfurchenbildung beteiligte Gene zu identifizieren. Dabei wurde erwartet, neue Zielgene von *snail* und insbesondere von *twist* aufzudecken. Im zweiten Teil der Arbeit sollte durch den entgegengesetzten Ansatz, die Wiederherstellung von Genaktivität im mutanten Hintergrund, untersucht werden, ob die Funktion von *twist* durch seine bereits bekannten Zielgene ersetzt werden kann. Dabei stand auch die Möglichkeit im Raum, ob *twist* möglicherweise weniger Zielgene für eine normale Ventralfurchenbildung aktivieren muß, als bisher angenommen. Die einzigen Zielgene von *twist*, von denen bereits bekannt war, daß sie für eine normale Ventralfurchenbildung notwendig sind, sind *snail* und *folded gastrulation*.

(Im folgenden wird von ‘Stadien’ gesprochen. Damit sind - wenn nicht anders gekennzeichnet - ausschließlich die in Kap. 2.2 definierten Gastrulationsstadien gemeint.)

Um die Ergebnisse der geplanten Rettungsexperimente bewerten zu können, wurde in *twist*-Mutanten zunächst die im Mesoderm verbliebene morphogenetische

Aktivität untersucht. Dadurch sollte gewissermaßen das “morphogenetische Restrauschen” des Mesoderms in *twist*-Mutanten bestimmt werden. In sechs aufeinanderfolgenden Gastrulationsstadien von *twist*-Mutanten wurde die Bandbreite der morphogenetischen Bewegungen mesodermaler Zellen ermittelt. Die Analyse ergab zuerst, daß morphogenetische Bewegungen in allen untersuchten Stadien gefunden werden. Die Bandbreite der Bewegungen hängt vom untersuchten Stadium ab. Sie nimmt innerhalb der untersuchten Entwicklungsphase mit fortschreitender Entwicklung erst zu und dann wieder ab (s. Abb. 2.11 ). Die Auswertung von Schnittserien ganzer Embryonen ergab, daß in jedem Stadium und in jedem Embryo immer Bereiche existieren, in denen praktisch keine morphogenetischen Bewegungen gefunden werden. Das gleiche gilt auch umgekehrt: Immer werden auch Bereiche gefunden, in denen verschieden starke Invaginationen feststellbar sind. Die quantitative Auswertung zeigte, daß sich die Häufigkeiten für die eine oder die andere morphogenetische Situation mit zunehmendem Alter der Embryonen verschieben: Tiefere Invaginationen nehmen von Stadium 0 bis 3 (siehe Kap. 2.2) an Häufigkeit zu, Regionen, in denen keine Invaginationen beobachtet werden können, werden zunehmend seltener. Das zeigt, daß, obwohl die Funktion von *twist* nicht vorhanden ist, in den mesodermalen Zellen noch Aktivität vorhanden sein muß, die ausreicht, um kleinere Invaginationen zu induzieren. Man könnte zwar auch annehmen, daß es sich um Einflüsse außerhalb des Mesoderms handelt, die dazu führen, daß sich in *twist*-Embryonen noch Invaginationen beobachten lassen. So könnte man darüber spekulieren, ob die gestörte Topologie - immerhin befindet sich ein großes zusätzliches Gewebe auf der Außenseite des Embryos - dazu führt, daß es zu Verschiebungen kommt, die einen Druck auf das Mesodermprimordium ausüben, der dazu führt, daß hier Zellen ins Innere des Embryos ausweichen. Zwei Argumente sprechen dagegen:

- 1.) Würde es sich bei den beobachteten Invaginationen um Ausweichbewegungen handeln, dann müßten solche Invaginationen auch in *snail*-Mutanten und *snail twist*-Doppelmutanten zu beobachten sein. Zwar gibt es in *snail* Mutanten kleinere Falten im Bereich des Mesoderms, aber diese sind klein und sehen anders aus als die Invaginationen von *twist*-Mutanten. In den Doppelmutanten sind solche Invaginationen oder Vertiefungen nicht zu beobachten, obwohl auch hier das Ektoderm eine große

Anzahl von zusätzlichen Zellen auf der Außenseite integrieren muß (Leptin and Grunewald, 1990).

2.) In *twist*-Mutanten lassen sich auf der apikalen Oberfläche der Zellen kleine Membranausstülpungen (Costa et al., 1993; Leptin and Grunewald, 1990) beobachten, die nicht das Ergebnis des Drucks ektodermaler Zellen sind, sondern eher auf zellautonome Ursachen hindeuten. Diese Ausstülpungen werden auch in Wildtypembryonen gefunden, wenn die Konstriktion der apikalen Zelloberflächen stattfindet (Costa et al., 1993; Leptin and Grunewald, 1990). Man muß daher annehmen, daß in *twist*-Mutanten noch die Fähigkeit für Zellformänderungen vorhanden ist, wenn auch sehr reduziert. Derartige Ausstülpungen finden sich in *snail*- oder *snail, twist*-Mutanten nicht.

Die nachfolgende qualitative und quantitative Analyse der Rettungsexperimente, in denen in *twist*-Mutanten mesodermspezifisch *snail, folded gastrulation* oder *snail* und *folded gastrulation* simultan exprimiert wurden, ergab, daß beide Konstrukte in der Lage waren, die morpogenetischen Defekte partiell zu kompensieren. In *twist*, PE-*fog*-Embryonen konnte beobachtet werden, daß sich die Apices der mesodermalen Zellen abflachten und kontrahierten. Es bildeten sich meist nur kleine Furchen. Schnitte, in denen keine morphogenetische Aktivität erkennbar war, wurden kaum gefunden. Die Häufigkeit tieferer Invaginationen nahm dagegen nur im letzten untersuchten Stadium zu. In *twist*, 2xPE-*snail*-Embryonen wurden ebenfalls Abflachungen der Apices beobachtet. Das Ausbleiben von morphogenetischen Bewegungen nahm stark ab. Tiefere Invaginationen waren etwa genauso häufig zu beobachten wie in *twist*-Mutanten. Die gemeinsame Expression beider Transgene in *twist*-Mutanten verbesserte die Morphogenese des Mesoderms erheblich. Auch hier konnten die apikalen Abflachungen beobachtet werden. Der dominierende Effekt war jedoch, daß die Häufigkeit tiefer Invaginationen stark zunahm und über mehrere Stadien hinweg anhielt. Die Qualität dieser Invaginationen war gegenüber der Expression der einzelnen Transgene ebenfalls verbessert. Dies zeigte sich in der Morphologie des invaginierten Epithels. Es bildete sich die typische epitheliale Röhre, die im Querschnitt rund erscheint, und in deren Zentrum ein kleines rundes Lumen erkennbar ist.

In den besten Fällen war dies mit der Situation in Wildtyp-Embryonen vergleichbar. Damit war gezeigt, daß *snail* und *folded gastrulation* prinzipiell in der Lage sind, die Frühphase der Mesoderminvagination ohne die Expression weiterer Zielgene von *twist* auszulösen. Die späteren Ereignisse, Auflösung des epithelialen Zellverbandes, Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm und Zellteilungen, können in den untersuchten Fällen nicht nachgewiesen werden. Dies war auch nicht zu erwarten, da für diese Prozesse weitere Zielgene von *twist* wie *dof*, *heartless* und *Cdc25<sup>string</sup>* notwendig sind. (Ein interessantes Experiment wäre es, diese Zielgene von *twist* gemeinsam mit *snail* und *folded gastrulation* in *twist*-Mutanten zu exprimieren. Wenn diese die entscheidenden Faktoren für die Postinvaginationsphase sind, dann würde man erwarten, daß sich auch die weiteren Prozesse in Abwesenheit der Funktion von *twist* wiederherstellen lassen.)

Aspekte, die von den Rettungskonstrukten nicht wiederhergestellt werden konnten, waren die folgenden:

- Die Invaginationen erfolgen gegenüber dem Wildtyp-Embryo mit einiger Verzögerung. Während in den *twist*, *PE-fog*; *2xPE-snail*-Embryonen tiefe Invaginationen erst ab Stadium 1 beobachtet werden, ist dies in Wildtyp-Embryonen bereits in Stadium 0 abgeschlossen.
- Die Invaginationen erstreckten sich nie über die gesamte Mesodermanlage, so, daß diese auf ihrer gesamten Länge invaginiert wäre. Es invaginierten bestenfalls große Teile des Mesoderms. Entlang der anterior-posterioren Achse des Mesoderms summierte sich dies zu maximal 60-70% der Mesodermanlage auf.
- Die Invagination war nicht von Dauer. Das invaginierte Gewebe tritt wie in *twist*-Mutanten in späteren Stadien wieder aus dem Inneren des Embryos heraus.

Eine Invagination, wie sie im Wildtyp stattfindet, kann also unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht wiederhergestellt werden. Dafür gibt es prinzipiell zwei mögliche Erklärungen:

*snail* und *folded gastrulation* sind in der Lage, eine Invagination, wie sie im Wildtyp stattfindet, zu induzieren, aber die experimentellen Bedingungen waren unzureichend.

*snail* und *folded gastrulation* sind nicht ausreichend, um den Ausfall von *twist* zu kompensieren. Die Konsequenz wäre, daß es weitere Zielgene von *twist* geben muß, die für eine normale Ventralfurchenbildung notwendig sind.

Um die erste Erklärung zu erörtern, müssen die beiden Transgene bewertet werden. Es konnte gezeigt werden, daß das Konstrukt 2xPE-*snail* in der Lage ist, den mesodermalen Phänotyp von *snail*-Mutanten völlig zu retten. Für das PE-*fog*-Konstrukt wurde gezeigt, daß mesodermspezifische Expression erzielt wird, und daß die Stärke der RNA-Expression etwa der von Wildtyp-Embryonen entsprach. Der Effekt der Expression auf die mesodermalen Zellen entsprach dem in der Literatur publizierten Effekt, den vergleichbare *fog*-Konstrukte auch auf andere Zellen haben. Dieser besteht vor allem darin, daß sich die Apizes der Zellen abflachen. Dieser Effekt wurde beobachtet, wenn *folded gastrulation* mit Hilfe eines Hitzeschock-Konstrukts im gesamten Embryo überexprimiert wurde (Morize et al., 1998). Der gleiche Effekt kann in den hier vorgestellten Experimenten beobachtet werden, wenn *folded gastrulation* im Mesoderm von *twist*-Mutanten exprimiert wird. Dies wurde insgesamt als Beweis dafür gewertet, daß das PE-*fog*-Konstrukt funktionsfähig ist und in geeigneter Weise exprimiert werden kann. Der einzige Einwand, der gemacht werden muß, ist, daß dieses Konstrukt seine Aktivität möglicherweise zu spät ausübt. In den Schnitten der *twist*, PE-*fog*-Embryonen erkennt man, daß in Gastrulationsstadium1 eine deutliche Abflachung beobachtet werden kann. Zu diesem Zeitpunkt ist in Wildtyp-Embryonen die Invagination bereits abgeschlossen. Es ist zwar denkbar, daß PE-*fog* andere Wirkungen hat, die vor den Abflachungen der Apizes stattfinden und wichtig für die Ventralfurchenbildung sind, aber diese sind bisher nicht bekannt und können daher nicht nachgewiesen werden. Wie entscheidend der Zeitpunkt der Expression von *folded gastrulation* für die durchgeführten Rettungsexperimente ist, und ob eine frühere Aktivität dieses Konstrukts zu besseren Ergebnissen geführt hätte, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden.

Ich halte es für wahrscheinlicher, daß *twist* weitere Zielgene hat, die neben *snail* und *folded gastrulation* zur Kontrolle der Ventralfurchenbildung beitragen. Diese Auffassung läßt sich durch folgende Überlegung begründen:

Wären *snail* und *folded gastrulation* die einzigen Zielgene von *twist*, dann wäre der *twist*-Phänotyp in Bezug auf die Ventralfurchenbildung die Summe zweier Einzelphänotypen, nämlich der fehlenden Aktivität von *folded gastrulation* und der reduzierten Aktivität von *snail* (*snail* ist in *twist*-Mutanten anfänglich noch exprimiert). Würde man unter diesen Annahmen in *twist*-Mutanten die Aktivität von *snail* vollständig wiederherstellen, so würde dies einer Situation entsprechen, in der im Mesoderm für die Ventralfurchenbildung nur die Aktivität von *folded gastrulation* fehlte. Wäre diese Annahme richtig, dann würde in *folded gastrulation*-Mutanten *snail* alleine die Ventralfurchenbildung steuern. Mit dem verwendeten 2xPE-*snail*-Konstrukt konnte gezeigt werden, daß der mutante Phänotyp von *snail*-Nullmutanten vollständig gerettet werden kann. Den gemachten Annahmen folgend, müßte man im Mesoderm von *twist*, 2xPE-*snail*-Mutanten also die gleiche Situation wie im Mesoderm von *folded gastrulation*-Mutanten vorfinden. Dies ist aber eindeutig nicht der Fall. In *folded gastrulation*-Mutanten invaginiert das Mesoderm zwar unkoordiniert, dafür aber vollständig. In *twist*, 2xPE-*snail*-Embryonen sind tiefe Invaginationen nur selten zu finden und die chaotische Morphogenese des Mesoderms, wie man sie in *folded gastrulation*-Embryonen beobachten kann, ist hier nicht festzustellen.

Es kann daher nahezu ausgeschlossen werden, daß *snail* und *folded gastrulation* die einzigen Zielgene von *twist* sind, die für die Ventralfurchenbildung notwendig sind, auch wenn diese alleine die Invagination in Teilen des Embryos bereits sehr weit steuern können. Wie im ersten Teil der Diskussion bereits angesprochen, ist ein anderes Zielgen von *twist* - *t48* - ein guter Kandidat für einen weiteren Faktor, der eine möglicherweise wichtige Rolle spielt. Dies ist aber offen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere zygotische Faktoren, die von *twist* abhängen, für die Mesoderminvagination notwendig sind.

Die Wiederherstellung der Aktivität von Zielgenen bei fehlender Funktion des Aktivators ist ein gutes System, um Modelle über genetische Kontrolle zu testen. Wenn weitere Zielgene von *twist* (oder auch von *snail*) identifiziert werden, können auch diese getestet werden. Wie in 3.1.4 schon vorgeschlagen, wäre ein Experiment, in dem Embryonen des Genotyps *twist*, PE-*fog*; 2xPE-*snail*, 2xPE-*t48* erzeugt werden, geeignet, um den möglichen Beitrag von *t48* zu analysieren. Wenn alle wichtigen Gene für die

frühe Mesodermmorphogenese identifiziert sind, kann dieses Testsystem in ähnlicher Form dazu genutzt werden, die weiteren Prozesse der Mesodermentwicklung zu analysieren.

### 3.3 Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von *snail*

In diesem Teil der Arbeit stand die Rolle von *snail* im Mittelpunkt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Rolle von *snail* als Repressor. Für mindestens 12 verschiedene ektodermal exprimierte Gene war bisher nachgewiesen, daß sie durch *snail* in der Mesodermanlage reprimiert werden. Obwohl der Phänotyp von *snail*-Mutanten es nahelegt, ist bisher nicht nachgewiesen, daß die Repression dieser Gene durch *snail* ein für die normale Invagination des Mesoderms notwendiger Prozess ist. Warum es in *snail*-Mutanten zum Ausbleiben der Ventralfurchenbildung kommt, ist unklar.

#### 3.3.1 Ektopische Expression von Zielgenen von *snail* im Mesoderm

Um zu untersuchen, wie essentiell die Repression durch *snail* ist, wurde unter verschiedenen genetischen Bedingungen analysiert, wie sich die ektopische Expression von *snail*-Zielgenen in der Mesodermanlage auf die Invagination des Mesoderms auswirkt.

Genetisch wurde eine Serie von Situationen analysiert, die sich durch eine zunehmende Derepression von Zielgenen von *snail* unterschieden (s. Tab.2, Kap. 2.3). Der Mechanismus, der für die Repression verantwortlich ist, erwies sich als empfindlich gegenüber Reduzierungen der Aktivität von *snail*. Eine Halbierung der Gendosis von *snail* führte bereits dazu, daß drei der untersuchten Zielgene von *snail* nicht mehr länger im Mesoderm reprimiert wurden. Gleichzeitig konnte ein schwacher Ventralfurchendefekt beobachtet werden. Dies zeigte, daß beide Kopien von *snail* funktionsfähig sein müssen, damit die Ventralfurchenbildung ungestört verläuft. Unter anderen genetischen Bedingungen konnten noch mehr Zielgene in der Mesodermanlage dereprimiert werden. Abgesehen von *snail*-Nullmutanten wurde dabei in *sna<sup>v2</sup>*-Embryonen die stärkste Derepression identifiziert. Mindestens 6 der 13 getesteten Zielgene von *snail* waren in diesen Embryonen dereprimiert.



Auffällig dabei war, daß es solche Zielgene gab, die sich sehr leicht dereprimieren ließen, während andere sich nie dereprimieren ließen, es sei denn, *snail* war völlig inaktiv. Empfindlich auf die Reduzierung der Aktivität von *snail* reagierten vor allem rhomboid, *ventral nervous system defective* und *short gastrulation*. Alle drei spielen eine Rolle bei der Musterbildung im Ektoderm bzw. Neuroektoderm. Gene die nur in *snail*-Nullmutanten dereprimiert waren, sind vor allem solche, die als Transkriptionsfaktoren bei der Neurogenese eine Rolle spielen. Dazu gehören *lethal of scute*, *scute*, *achaete*. Ebenfalls unempfindlich auf die partielle Reduzierung der Aktivität von *snail* reagierten *Delta*, *PSI* und *brinker*. Die Gene *shotgun*, *stardust* und *crumbs*, die Eigenschaften wie Polarität und Adhäsion einer Zelle bestimmen, zeigten eine mittlere Empfindlichkeit auf reduzierte *snail*-Aktivität und waren nur in *sna*<sup>V2</sup> und *sna*-Nullmutanten im Mesoderm exprimiert.

Kann man aus dieser abgestuften Empfindlichkeit innerhalb der Gruppe der Zielgene von *snail* Schlüsse ziehen? Man könnte vermuten, die Abstufung spiegele wieder, daß die Repression der Zielgene von *snail* unterschiedlich wichtig ist. Bei welchen Genen die Repression möglicherweise wichtiger ist als bei anderen, darüber läßt sich in zwei unterschiedliche Richtung spekulieren:

Die erste Möglichkeit ist, daß die Repression der Zielgene von *snail*, die nur in *snail*-Nullmutanten dereprimiert sind, wichtiger ist als die der anderen. Man könnte annehmen, daß deren Repression möglichst effektiv sein muß, denn die Derepression dieser Zielgene korreliert genau mit dem Phänotyp der *snail*-Nullmutanten.

Die andere Möglichkeit nimmt das Gegenteil an, nämlich, daß die Repression der weniger empfindlichen Zielgene die wichtigere ist. Dafür würde sprechen, daß deren Derepression immer mit einem Defekt der Ventralfurchenbildung korreliert.

Beide Möglichkeiten sind spekulativ. Um zu vergleichen, wie wichtig die Repression einzelner Zielgene von *snail* ist, kann man durch Überexpression einzelner *snail*-Zielgene im Mesoderm untersuchen, ob dies Auswirkungen auf die Morphogenese hat. Dies ist möglich mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems. Derartige Experimente wurden in verschiedenen Labors durchgeführt. Eine Zusammenstellung ist in Tab.3, Kap. 2.3 wiedergegeben. Acht verschiedene Zielgene von *snail* wurden mit Hilfe von maternalen Gal4-Treiberlinien überexprimiert. In keinem einzigen Fall wurde ein Defekt bei der

Invagination des Mesoderms beobachtet. Dabei spielte es keine Rolle, wie empfindlich die einzelnen Gene auf verminderte Aktivität von *snail* reagieren. Sowohl *lethal of scute* als auch *short gastrulation* hatten bei Überexpression keine Auswirkung auf die Ventralfurchenbildung.

*Indizien, die dafür sprechen, daß Repression durch snail eine notwendige Voraussetzung für die Morphogenese des Mesoderms ist*

Liest man Tab.3, Kap. 2.3 in der Vertikalen und schließt die morphologischen Daten mit ein, dann fällt auf, daß von oben nach unten die Zahl der dereprimierten Gene, und in gleichem Maße die Schwere der beobachteten Defekte bei der Ventralfurchenbildung zunimmt. Diese ist meiner Meinung nach die wichtigste Korrelation, die man der Tabelle entnehmen kann. Sie legt den Schluß nahe, daß *snail* nicht einzelne Zielgene hat, deren Repression essentiell ist, sondern daß die Störung der Ventralfurchenbildung in *snail*-Mutanten ein akkumulativer Effekt ist: Je mehr Zielgene dereprimiert sind, desto gravierender ist die Auswirkung auf die Morphogenese des Mesoderms. Die gemeinsame Expression vieler oder gar aller Zielgene von *snail*, die in der Summe die Neurogenese, die Musterbildung des Ektoderms und grundlegende Eigenschaften einer Zelle wie Adhäsion und Polarität kontrollieren, hat dann derartig schwerwiegende Auswirkungen auf die Mesodermanlage, daß die Invagination völlig blockiert wird. Der interessanteste Fall, der in diesem Zusammenhang untersucht wurde, ist das Allel *sna<sup>v2</sup>*. Eine erste Analyse dieses Allels wurde von Hemavathy et al. vorgenommen. In ihrer Arbeit wurden drei der Zielgene von *snail* untersucht: *single-minded*, *lethal of scute* und *rhomboid*. Sie hoben hervor, daß das Mesoderm trotz der Derepression ektodermaler Gene noch ivaginieren konnte. Im Laufe meiner Arbeit wurde für mindestens drei weitere Zielgene nachgewiesen, daß sie in *sna<sup>v2</sup>*-Mutanten nicht mehr reprimiert sind: *ventral nervous system defective*, *short gastrulation*, *crumbs* und möglicherweise auch *stardust*. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, daß in *sna<sup>v2</sup>*-Mutanten außer *lethal of scute* 5 weitere Zielgene von *twist* weiterhin reprimiert sind. Nach einer genauen morphologischen Untersuchung von *sna<sup>v2</sup>*-Mutanten im Verlauf

dieser Arbeit, erscheint es mir wichtig hervorzuheben, daß die Invagination in *sna*<sup>v2</sup>-Mutanten zwar stattfindet, aber deutlich gestört ist, was auch für die Ausbreitung des Mesoderms nach der Invagination gilt.

Würde man die Analyse von *sna*<sup>v2</sup>-Mutanten isoliert betrachten, dann wäre es eher eine Glaubensfrage, wie man die Morphogenese und die Expression der Zielgene in *sna*<sup>v2</sup>-Mutanten bewertet, und welchen Aspekt man für wichtiger hält: Die Invagination des Mesoderms trotz partieller Derepression oder die Korrelation von partieller Derepression und verminderter Fähigkeit des Mesoderms zu invaginieren. Der Vergleich der verschiedenen genetischen Situationen, die in Tab. XXX zusammengefasst sind, läßt meiner Meinung nach diesen Spielraum nicht mehr offen, und legt nahe, daß der mutante Phänotyp in *sna*<sup>v2</sup>-Mutanten genauso wie die Blockierung der Ventralfurchenbildung in *snail*-Nullmutanten das Produkt eines additiven Effektes ist. Die Annahme, daß es sich beim *snail*-Phänotyp um einen additiven Effekt handelt, würde auch erklären, warum die Überexpression einzelner Zielgene in der Mesodermanlage - soweit bisher getestet - nie einen Effekt erzielt. Die Expression eines einzelnen Zielgens, so die Schlußfolgerung, ist vermutlich nicht ausreichend, die Eigenschaften des Mesoderms so grundlegend zu ändern, daß es zu einer Blockierung der Ventralfurchenbildung kommt.

Die vorangehenden Überlegungen basieren auf Indizien und sind nicht bewiesen. Es ist nicht völlig auszuschließen, daß es ein einzelnes Zielgen von *snail* geben kann, dessen Derepression alleine die Ventralfurchenbildung blockiert. Der einzige Fall, der bisher bekannt ist, in dem die Überexpression eines Gens in der Mesodermanlage zum Ausfall der Ventralfurchenbildung führte, ist *huckebein* (Bronner et al., 1994). *huckebein* ist jedoch kein Zielgen von *snail*, sondern *snail* selbst ein Zielgen für Repression durch *huckebein* und der mutante Phänotyp damit erklärbar.

#### *Zwei potentielle neue Zielgene von snail*

Die in Kap. 2.3 vorgelegten Ergebnisse beruhten vor allem auf der Auswertung von in situ-Hybridisierungen an Embryonen. Zu diesem Zweck waren DIG-markierte RNA-Sonden von 13 Zielgenen von *snail* hergestellt worden. Bei zweien dieser Zielgene

war vorher nicht gezeigt worden, daß sie möglicherweise Zielgene von *snail* sein könnten. Dabei handelte es sich um *ventral nervous system defective* und *stardust*. *ventral nervous system defective* ist ein Transkriptionsfaktor mit einer Homeodomäne, der bei der Musterbildung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt (Jimenez et al., 1995; Skeath et al., 1994). Interessanterweise ist *ventral nervous system defective* nicht in den Nachbarzellen der *snail*-Domäne exprimiert. Dort findet man die Expression von *single-minded* in je einer Zellreihe dorsal zu beiden Seiten des Mesoderms. *single-minded* reprimiert die Expression von *ventral nervous system defective* und setzt damit die ventrale Grenze von dessen Expressionsdomäne (Estes et al., 2001). In *snail*-Mutanten ist *single-minded* in der gesamten Mesodermanlage exprimiert. Man würde also erwarten, daß sich in *snail*-Mutanten an der Expression von *ventral nervous system defective* nichts ändert, zumindest jedoch, daß *ventral nervous system defective* im Mesoderm dieser Mutanten nach wie vor nicht exprimiert ist. Die in situ-Daten zeigen jedoch das Gegenteil. *ventral nervous system defective* ist in der Mesodermanlage exprimiert, obwohl *single-minded* dort ebenfalls exprimiert ist. Warum in dieser Situation *ventral nervous system defective* nicht durch *single-minded* reprimiert wird, ist unklar. Möglicherweise unterscheidet sich der Mechanismus der Repression von *ventral nervous system defective* im Mesoderm von dem im Mesektoderm. Das wäre beispielsweise dann so, wenn *ventral nervous system defective* im Mesoderm ein direktes Zielgen von *snail*, dies im Mesektoderm aber durch unbekannte Faktoren anders wäre. In heterozygoten *snail*<sup>+/+</sup>-Embryonen ist *ventral nervous system defective*, aber nicht *single-minded* dereprimiert. Das legt nahe, daß *ventral nervous system defective* tatsächlich ein direktes Zielgen von *snail* sein könnte.

*stardust* kodiert für mehrere Isoformen von Membran-assoziierten (oder zytosplasmatischen) Guanylat-Kinasen (MAGUK) und interagiert mit *crumbs* bei der Etablierung apikobasaler Zellpolarität in verschiedenen Zelltypen (Bachmann et al., 2001; Grawe et al., 1996; Hong et al., 2001; Muller and Wieschaus, 1996).

Unter Einschluß dieser neuen Kandidaten sind mindestens 15 verschiedene Zielgene von *snail* in *Drosophila* bekannt (s.Tab.2, Kap. 2.3). In anderen Modellorganismen ist *snail* unter anderem als Regulator von Epithel-Mesenchym-Transitionen (EMTs) identifiziert worden. Dabei spielte vor allem die Kontrolle der

Aktivität von E-Cadherin eine wesentliche Rolle (Knust and Leptin, 1996; Nieto, 2002; Tepass et al., 1996). Das Drosophila-Homolog von E-Cadherin, *shotgun*, wird ebenfalls von *snail* reprimiert. Allerdings ist *shotgun* zum Zeitpunkt der Invagination des Mesoderms noch als maternales Protein vorhanden. Die auf RNA-Ebene beobachtete Repression von *shotgun* scheint daher nicht essentiell für die Ventralfurchenbildung zu sein. Nach der Invagination des Mesoderms findet im Mesoderm eine EMT statt. Es wäre möglich, daß die Repression von *shotgun* (und vielleicht auch anderer Faktoren) für diese Phase der Mesodermentwicklung essentiell ist. Warum die Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Verlauf der frühen Mesodermmorphogenese so dynamisch reguliert wird, ist im Detail ungeklärt. Es ist jedoch leicht nachzuvollziehen, daß Zellen, die ein Epithel bilden, andere Adhäsionseigenschaften haben müssen als eine Gruppe von Zellen, die einen lockeren Zellverband bildet und als Einzelzellen wandern.

Der Co-Repressor von *snail*, das Drosophila Homolog von *CtBP*, zeigte nur eine schwache genetische Interaktion mit *snail*, allerdings wurden auch nur transheterozygote Embryonen oder Embryonen von heterozygot mutanten Müttern untersucht. Die Reduzierung der Dosis von *dCtBP* um die Hälfte hatte keinerlei Effekte. In doppelt-heterozygoten *snail/+; dCtBP/+* -Embryonen kann jedoch beobachtet werden, daß gegenüber heterozygoten *snail/+* -Embryonen zusätzlich *single-minded* dereprimiert wird. Damit war immerhin in einem Fall eine genetische Interaktion zwischen *snail* und *dCtBP* nachgewiesen. Eine Auswirkung auf die Invagination des Mesoderms konnte jedoch nicht festgestellt werden.

### 3.3.2 *snail* als möglicher Aktivator von Genaktivität im Mesoderm

Das Gen *snail* agiert im Mesoderm als Repressor von Transkription. Wie gezeigt, gibt es eine ganze Reihe von Genen, die von *snail* reprimiert werden und nur dann im Mesoderm exprimiert werden, wenn die Aktivität von *snail* reduziert wird oder gänzlich ausfällt. Es gibt jedoch auch Fälle, in denen die Aktivität von *snail* die Voraussetzung für die Expression von Genen ist. Für einige Gene war bereits bekannt, daß ihre Expression im Mesoderm von der Aktivität von *snail* abhängt. Wenn die Aktivität von

*snail* im Mesoderm nicht vorhanden ist, dann geht die Expression dieser Gene stark zurück. Zu diesen gehören beispielweise die Repressoren *serpent* und *zfh-1* (s Tab.3, Kap. 2.3).

Die Annahme, daß *snail* auch für die Aktivierung von Genaktivität benötigt werden könnte, beruht vor allem auf der Auswertung von Expressionsmustern der betreffenden Gene. In welcher funktionellen Beziehung die Aktivität von *snail* zur Expression dieser Gene steht, ist nicht geklärt. Man kann sich dazu verschiedene Mechanismen vorstellen.

Die einfachste Annahme wäre, daß *snail* direkt an die betreffenden Gene bindet und deren Transkription aktiviert. Dies wäre insofern unerwartet, als *snail* zu einer Klasse von Proteinen gehört (Zinkfingerproteine), die typischerweise Repressoren sind (Ausnahmen sind mir nicht bekannt).

Eine andere denkbare Möglichkeit wäre, daß *snail* indirekt als Aktivator agiert, indem es spezifisch andere Repressoren reprimiert, was dazu führt, daß die Zielgene dieser Repressoren im Mesoderm exprimiert werden können.

Eine dritte Möglichkeit wäre, daß *snail* nur ein sehr indirekter Aktivator ist. Dies wäre der Fall, wenn der Rückgang von Genexpression in *snail*-Mutanten nur auf unspezifische Effekte zurückzuführen wäre, die darauf beruhen, daß beispielsweise ektodermale Transkriptionsfaktoren mit mesodermalen Transkriptionsfaktoren interagieren oder um Bindungsstellen an Promotoren kompetitieren. Würde dies zutreffen, dann wäre es die Aufgabe von *snail* alle unerwünschten Faktoren aus dem Mesoderm herauszuhalten und gewissermaßen einen basalen Ordnungszustand aufrecht zu erhalten, der die Expression mesodermaler Gene und die normale Entwicklung des Mesoderms erst ermöglicht.

Welche dieser Möglichkeiten der Situation im Mesoderm am nächsten kommt, ist mit den vorliegenden Daten nicht zu entscheiden (und vielleicht trifft ja auch mehr als eine zu). Die interessanteste und folgenreichste Möglichkeit ist die erste. Würde es zutreffen, daß *snail* auch direkt andere Zielgene aktivieren kann, so würde dies natürlich bedeuten, daß unter diesen Zielgenen auch solche sein könnten, die instruktiv an der Ventralfurchenbildung beteiligt sind. Um dieses Problem zu lösen sollte man in zwei Schritten vorgehen:

1) Zuerst müßte man die Logik der Funktion von *snail* klären, d.h.: herausfinden, welche der oben genannten Möglichkeit der Wirklichkeit am nächsten kommt. Dies könnte mit Fusionskonstrukten versucht werden, mit denen *snail* entweder in einen starken Repressor oder in einen starken Aktivator verwandelt wird. Solche Fusionen könnte man mit der Aktivierungsdomäne von VP16 und der Repressordomäne von Engrailed konstruieren (Berger et al., 1990; Cress and Triezenberg, 1991; Han and Manley, 1993; Jaynes and O'Farrell, 1991; Markel et al., 2002; Sadowski et al., 1988). Diese müßten dann in *snail*-Mutanten mesodermsspezifisch exprimiert und ihre Auswirkung auf die Expression mesodermaler und ektodermaler Gene untersucht werden.

Folgende Situationen könnten eintreten:

- a) Hätte *snail* nur Zielgene, die es reprimiert, dann würde ein SnaVP16-Fusionsprotein alle dieser Gene aktivieren statt reprimieren. Man würde nachweisen können, daß die bekannten Zielgene, die von *snail* normalerweise reprimiert werden, nun aktiviert werden. Dies wäre gewissermaßen die Positivkontrolle, denn es würde zeigen, ob das Fusionsprotein funktioniert. Wenn *snail* ein reiner Repressor und diese Funktion essentiell wäre, dann würde man in solchen Embryonen den Phänotyp von *snail*-Nullmutanten erwarten.
- b) Hätte *snail* aber auch Zielgene, die es direkt aktiviert, dann würden durch SnaVP16 zusätzlich zu den normalerweise reprimierten auch diese aktiviert. Der resultierende Phänotyp wäre dann davon abhängig, ob die Aktivierung dieser Gene essentiell ist oder nicht. Wäre die Aktivierung dieser Gene notwendig, die Repression hingegen nicht, dann würde dies zu dem paradoxen Fall führen, daß man einen Repressor (mit bislang verborgenen Aktivatoreigenschaften) in einen Aktivator verwandelt und die Mesodermentwicklung möglicherweise völlig normal abläuft.
- c) Wäre *snail* nur ein Repressor (und diese Eigenschaft notwendig) und man würde SnaEN im Mesoderm von *snail*-Mutanten exprimieren, dann würde man mit diesem Konstrukt im Grunde die Wildtypsituation wiederherstellen.
- d) Schließlich, wenn *snail* ein essentieller Aktivator wäre, dann würde die Expression von SnaEN dazu führen, daß die sonst aktivierten Zielgene von *snail* nun reprimiert werden und man würde einen Gastrulationsphänotyp erwarten.

Diese Experimente könnten helfen zwischen den gegebenen Möglichkeiten zu diskriminieren. Problematisch wäre der Fall, wenn *snail* sowohl ein Aktivator als auch ein Repressor wäre und in beiden Fällen eine essentielle Funktion hätte. Dann würde der oben beschriebene Versuchsansatz nicht zum Ziel führen.

2) Hätte man die Logik geklärt, dann wäre es das nächste Ziel, die wichtigen Zielgene, bzw. neue Zielgene von *snail* zu identifizieren. Dies ließe sich mit genetischen wie auch mit molekularen Methoden verfolgen. Stichworte dazu wären:

- Durchführung eines “Enhancer-Screens”, Überexpressions-Screen mit *sna/+* als genetischem Hintergrund
- “Expression-Profiling”: *snail*-Homozygote versus Wildtypembryonen.

Die Rolle von *snail* bei der Mesodermentwicklung ist nach wie vor ungeklärt. Es gibt Indizien, die darauf hindeuten, daß *snail* als Repressor essentiell ist und daß der mutante Phänotyp von *snail*-Nullmutanten ein additiver Effekt ist. Es ist dennoch nicht ausgeschlossen, wie eine Anzahl von Beispielen zeigt, daß *snail* - entweder direkt oder indirekt - auch die Aktivierung anderer Gene bewirkt.

### **3.4 Die Koordination von Morphogenese und Zellteilungen während der Ventralfurchenbildung durch *tribbles***

In dem in Kapitel 2.4 vorgelegten Teil der Arbeit wurde gezeigt, daß *tribbles* als Teil eines neuen Mechanismus in der Lage ist, Zellteilungen zu unterdrücken um einen morphogenetischen Prozess möglich zu machen. In zwei verschiedenen Prozessen konnte nachgewiesen werden, daß der Verlust der Funktion von *tribbles* dazu führt, daß es zu unüblichen Zellteilungen kommt. In den Polzellen werden sporadische Teilungen festgestellt, die in diesem Abschnitt der Entwicklung normalerweise nie beobachtet werden. Der einzige andere bekannte Fall, in dem es während der frühen Morphogenese zu Teilungen der Polzellen kommt, ist der Phänotyp von *nanos*-Mutanten (Deshpande et al., 1999). Die Polzellen bilden sich in Wildtypen etwa zu Beginn der Zellularisierung



und teilen sich in dann während der Zellularisierung noch zweimal. Danach erfolgen für den Rest der Embryonalentwicklung keine weiteren Polzellteilungen mehr (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Der in *tribbles*-Mutanten beobachtete mutante Phänotyp zeigt, daß die Polzellen prinzipiell die Fähigkeit haben, sich auch in anderen Phasen der Embryonalentwicklung zu teilen. Die Komponenten, die für das Durchlaufen der Mitose gebraucht werden, müssen in den Polzellen vorhanden sein. Der Polzellphänotyp von *tribbles*-Mutanten gibt Anlaß zu der Auffassung, daß die Polzellen durch unbekannte Faktoren in einen mitotisch inaktiven Zustand versetzt werden. *tribbles* ist vermutlich einer dieser Faktoren. Da immer nur in wenigen Polzellen Mitosen gesehen wurden, kann angenommen werden, daß es weitere Faktoren gibt, die an der Kontrolle der Mitosen in Polzellen beteiligt sind, und daß diese Faktoren in *tribbles*-Mutanten weiterhin aktiv sind. Es scheint, als habe der Wegfall von *tribbles* in den Polzellen zu einer Grenzsituation geführt, in der das Verhältnis von mitotischen Inhibitoren und Aktivatoren nahezu ausgeglichen ist. In dieser Situation gelingt es einzelnen Zellen der Teilungshemmung zu entkommen.

Auch im Mesoderm agiert *tribbles* als mitotischer Inhibitor, wie der Phänotyp von *tribbles*-Mutanten eindrucksvoll demonstriert. Der Phänotyp verdeutlicht darüber hinaus die Notwendigkeit der Aktivität von *tribbles* in diesem Kontext: Fällt die Blockade der Zellteilungen aus, kommt es zu schweren Gastrulationsdefekten, die in einem Teil der Embryonen zur Letalität führen. Die Expression von  $Cdc25^{string}$  im Mesoderm versetzt das Mesoderm prinzipiell in die Lage die erste Gruppe von Zellen zu sein, die sich in Zellzyklus 14 teilen. Dabei ist die RNA-Expression von  $Cdc25^{string}$  im Mesoderm zu Beginn relativ schwach, wie der Vergleich mit anderen Domänen, in denen  $Cdc25^{string}$  exprimiert ist, zeigt. Dies zeigt, daß bereits geringe Mengen von  $Cdc25^{string}$  in der Lage sind Mitosen auszulösen. Wie effektiv  $Cdc25^{string}$ -RNA im Mesoderm translatiert wird und wieviel  $Cdc25^{string}$ -Protein tatsächlich benötigt wird um Zellteilungen auszulösen, bleibt eine offene Frage. Es scheint jedenfalls so, daß das Verhältnis der Expressionsniveaus von  $Cdc25^{string}$  und *tribbles* zueinander über das mitotische Verhalten der mesodermalen Zellen entscheidet: Hebt man die Expression von  $Cdc25^{string}$  an (z.B. durch 2xPEe-stg, #3b) oder reduziert man die Expression von *tribbles* (wie in Mutanten aus EP(3)3519, im weiteren  $trbl^{3519}$  genannt) oder analysiert man transheterozygote

Embryonen des Genotyps 2xPEe-stg/ trbl<sup>3519</sup>, erhält man immer den gleichen mutanten Phänotyp: frühzeitige Teilungen im Mesoderm zu einem Zeitpunkt, wenn die Ventralfurchenbildung unmittelbar bevorsteht.

Unter Berücksichtigung der Daten von J. Mata et al., die *tribbles* eine Funktion bei der Proteolyse von Cdc25<sup>string</sup> nachweisen, läßt sich das ausbalancierte Verhältnis von Cdc25<sup>string</sup> und *tribbles* mehr funktional diskutieren (Mata et al., 2000). Dann ist möglicherweise der entscheidende Punkt, daß der proteolytische Mechanismus, an dem *tribbles* (und vermutlich weitere Faktoren, da *tribbles* keine Protease ist) beteiligt ist, unter normalen Bedingungen eine begrenzte Kapazität hat. Bei Überexpression von Cdc25<sup>string</sup> reicht die Kapazität nicht mehr aus, um Zellteilungen zu inhibieren. Auch die Ergebnisse der anderen Experimente, in denen die Balance zwischen *tribbles* und Cdc25<sup>string</sup> verändert wurde, sind unter diesem Gesichtspunkt erklärbar. Unklar ist, wie es dazu kommt, daß sich die mesodermalen Zellen in Wildtypen schließlich doch teilen. In situ-Hybridisierungen mit einer *tribbles*-spezifischen RNA-Sonde zeigen, daß zumindest die RNA-Expression von *tribbles* im Mesoderm auch nach der Ventralfurchenbildung noch bestehen bleibt. Möglich ist, daß Tribbles nun selbst abgebaut wird. Eine andere Möglichkeit ist, daß die Expression von Cdc25<sup>string</sup> im Mesoderm mit der Zeit zunimmt und langsam einen Schwellenwert überschreitet, ähnlich wie man es sich bei den Überexpressionsexperimenten vorstellen kann. Für die letztere Vorstellung spricht, daß es tatsächlich den Anschein hat, daß die Expression von Cdc25<sup>string</sup> nach schwachem Beginn im Verlauf der Gastrulation zunimmt (Abb. 2.32).

Die frühzeitigen Mitosen in der mitotischen Domäne 8 (MD8) von *tribbles*-Mutanten führen nicht zu offensichtlichen morphogenetischen Defekten. Die Zellen dieser Domäne (Anlage des Stomodeums) invaginieren ohne Probleme. Auch im Wildtyp teilen sich diese Zellen vor ihrer Invagination (etwa 20-30 vorher, Foe, 89). In den *tribbles*-Mutanten verdoppelt sich der zeitliche Abstand zwischen Teilung und Invagination der stomodealen Anlage. Ein Aufeinandertreffen von Mitosen und Morphogenese kommt nicht zustande

Man kann spekulieren, ob das Mesoderm auch dann noch invaginieren würde, wenn die Teilungen in *tribbles*-Mutanten rechtzeitig vor dem Beginn der Ventralfurchenbildung abgeschlossen wären. Es ist nicht klar, ob eine Verdopplung der

Anzahl an mesodermalen Zellen (bei gleicher räumlicher Ausdehnung der Mesodermanlage) zu Problemen bei der Invagination führen würde. Experimentell ließe sich vielleicht eine Situation herstellen, in der man die Teilungen der mesodermalen Zellen noch früher stattfinden lassen könnte. Dann könnte man theoretisch testen, ob die Mesodermanlage auch mit der doppelten Anzahl von Zellen noch in der Lage ist eine normale Ventralfurche zu bilden. Aber da die Teilungen in *tribbles*-Mutanten bereits unmittelbar nach Ende der Zellularisierung einsetzen, würde eine zeitliche Vorverlegung bedeuten, daß Zellularisierung und Mitosen gleichzeitig stattfänden, was möglicherweise zu anderen Defekten führen würde.

Der Versuch, durch Überexpressionen von *tribbles* auch die Mitosen in anderen Zellen und zu anderen Zeitpunkten der Entwicklung mit Hilfe einer EP-Linie (#EP(3)3519) zu beeinflussen, mißlang. Der Grund dafür kann sein, daß die Expression der verwendeten Linie nicht ausreichend war. Gegen dieses Argument würde allerdings sprechen, daß

- a) *tribbles* bei den Überexpressionen mit Hilfe einer RNA-Sonde nachgewiesen werden konnte (Seher and Leptin, 2000).
- b) *tribbles* unter anderem im Verlauf eines Überexpressions-Screens identifiziert wurde, bei dem die Linie #EP(3)3519 erfolgreich benutzt wurde.

Eine andere Erklärung könnte sein, daß die alleinige Überexpression von *tribbles* nicht ausreicht, weil andere Faktoren entweder fehlen oder nicht in genügender Menge zur Verfügung stehen, und daß diese anderen Faktoren auch von Kontext zu Kontext wechseln können. J. Großhans und J. Mata konnten jedenfalls zeigen, daß es mit Hilfe von UAS-Konstrukten (UAS-*tribbles*) möglich ist, in den Zellzyklus in einem anderen Entwicklungszusammenhang - in der Flügelimaginalscheibe - einzugreifen (Grosshans and Wieschaus, 2000; Mata et al., 2000). Andere Effekte wurden in beiden Arbeiten nicht berichtet. Es ist daher gut möglich, daß die alleinige Überexpression von *tribbles* nur in wenigen Entwicklungszusammenhängen einen Effekt hat. Ein möglicher Kandidat für einen Faktor, der mit *tribbles* gemeinsam interagieren könnte, wurde möglicherweise mit *Df(3L)BK10* aufgedeckt. Doppeldefizienzen für *tribbles* und *Df(3L)BK10* zeigten keinerlei Effekte, wodurch ausgeschlossen werden konnte, daß *tribbles* und der andere Faktor Teile eines redundanten Mechanismus sein sind. Die Expression von *tribbles* war

in Embryonen homozygot für diese Defizienz nicht reduziert, womit auch eine Kontrolle der Expression von *tribbles* durch das andere Gen ausgeschlossen werden konnte. Dieses Gen wurde mittlerweile identifiziert und *frühstart* (*frs*) genannt. Welche Funktion *frühstart* hat, ist zur Zeit unklar. Die Proteinsequenz gibt keinen Aufschluß und es ist ubiquitär exprimiert (J. Großhans, EDRC, Edinburgh, 2001). Ob und welche Effekte die gemeinsame Expression von *tribbles* und *frühstart* haben könnte, ist bisher nicht publiziert worden.

#### *Protein-Sequenz von Tribbles und verwandte Proteine*

Die Analyse seiner Primärsequenz hatte ergeben, daß Tribbles große Ähnlichkeit zu Serin/Threonin-Kinasen der SNF1-Klasse hat. Die Ähnlichkeit von Tribbles zu den bekannten Serin/Threonin-Kinasen beschränkt sich jedoch auf die Subdomänen IV-XI. Die Subdomänen I-III scheinen nicht vorhanden zu sein. Die weitere Untersuchung der Sequenz von Tribbles zeigte dann, daß in Tribbles einige der Aminosäuren, die unter allen anderen bekannten Serin/Threonin-Kinasen konserviert sind, ausgetauscht sind. Diese Aminosäuren liegen in der Sub-Domäne VIb, in der die eigentliche katalytische Reaktion stattfindet. Diese konservierten Aminosäuren haben in allen bekannten funktionellen Serin/Threonin-Kinasen eine essentielle Rolle für die katalytische Funktion dieser Proteine. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei Tribbles um eine inaktive, oder “tote” Kinase handelt. Die in der Datenbankrecherche gefundenen 7 Vertebratenproteine teilen mit Tribbles insbesondere die Merkmale, die nahelegen, daß es sich bei Tribbles um eine inaktive Form einer Kinase handelt (Mayumi-Matsuda et al., 1999; Wilkin et al., 1996; Wilkin et al., 1997). Faßt man die Strukturmerkmale dieser Proteine zusammen, so fehlen ihnen die Bereiche der Kinasedomäne, die für die Aufnahme von ATP gebraucht werden, der katalytische Bereich ist vermutlich inaktiv und die Domäne (VIII), die für die Substraterkennung gebraucht wird, zeigt hohe Homologie zu den bekannten Kinasen. Die Proteine der “Tribbles-Gruppe” sind nach dieser Einschätzung also strukturell eigentlich nicht in der Lage eine Phosphorylierungsreaktion durchzuführen, haben aber möglicherweise noch die

Eigenschaft, Substrate zu erkennen und zu binden. Aus diesen vermutlichen Eigenschaften lassen sich Schlüsse ziehen. Es könnte sein, daß Tribbles und die verwandten Proteine als kompetitive Inhibitoren die Aktivität einer (oder mehrerer) anderen Kinase inhibieren. Wenn dies der Mechanismus ist, durch den Tribbles seine Funktion ausübt, dann wäre es wichtig zweierlei zu wissen:

- 1.) Welche Substrate bindet Tribbles?
- 2.) Welche andere Kinase wird von Tribbles kompetitiv inhibiert?

Die Antworten auf diese Fragen sollten helfen zu verstehen, wie Tribbles die Zellteilungen im Mesoderm unterdrückt. Eine interessante Möglichkeit wäre es, Tribbles von einer inaktiven in eine aktive Kinase zu verwandeln, indem man die “falschen” Aminosäuren gegen die ansonsten bei Serin/Threonin-Kinasen konservierten oder invarianten Aminosäuren austauscht. Dies könnte ein Ansatz sein, die Substrate der von Tribbles inhibierten Kinase(n) zu identifizieren.

Es läßt sich auch noch folgende Überlegung anstellen: Wenn Tribbles tatsächlich eine andere Kinase inhibiert, dann müßte die Verlustmutation dieser Kinase den gleichen Phänotyp verursachen wie eine Mutation von *tribbles* oder *frühstart*. J. Großhans und E. Wieschhaus wiederholten den Translokations-Screen, durch den sie auch *tribbles* und *frühstart* identifiziert hatten, und untersuchten das Genom diesmal auf weitere zygotische Gene, die an der Kontrolle der Zellteilungen im Mesoderm beteiligt sind. Es wurden keine weiteren zygotischen Gene gefunden, die im Falle der Deletion einen ähnlichen Phänotyp verursachten wie *tribbles* oder *frühstart* (J. Großhans, persönliche Korrespondenz). Wenn die Inhibition einer Kinase der Schlüsselmechanismus der Teilungskontrolle im Mesoderm ist, dann erhöht das Ergebnis des neuen Translokations-Screens die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei der postulierten Kinase um einen maternalen Faktor handelt.

Eine weitere wichtige Frage, die beantwortet werden muß, um den Mechanismus aufzuklären, durch den Tribbles die Zellteilungen im Mesoderm kontrolliert, lautet: Welche Funktion hat Frühstart und in welcher Beziehung stehen Tribbles und Frühstart zueinander? Dies ist bisher völlig unklar.

Wenn man die Ergebnisse von J. Mata et al. mit in die Überlegungen einbezieht, dann ergeben sich zusätzliche Fragen:

Wie kontrolliert *tribbles* die Proteolyse von Cdc25<sup>Cdc25string</sup> und Twine?

Wieso hat der Verlust der Aktivität von *tribbles* in der Keimbahn im Vergleich zum Mesoderm einen gegensätzlichen Effekt?

Möglicherweise ist die Aktivität von *tribbles* weniger spezifisch, als angenommen und es handelt sich bei Tribbles um ein Protein, das durch Interaktion mit anderen unbekannten Partnern erst seine Spezifität erlangt und in verschiedenen Zusammenhängen unterschiedliche Wirkungen ausübt. Dies wird unterstützt durch Ergebnisse von P. Rorth et al.. Sie konnten zeigen, daß Tribbles auch beim Prozess der “border cell migration” eine wichtige Rolle spielt. Tribbles ist hier am Ubiquitin-abhängigen Abbau des Transkriptionsfaktors *slbo* beteiligt und kann direkt an *slbo* binden.

Es könnte also sein, daß Tribbles Teil einer Proteinabbau-Maschinerie ist, die je nach Kontext verschiedene Proteine abbaut. Und vielleicht ist die Substratbindungsdomäne für diese Funktion das wichtigste strukturelle Detail von Tribbles, weil sie dazu benutzt werden könnte, verschiedene Proteine einem gerichteten Abbau zuzuführen. Die drei bisher identifizierten Zielproteine, die durch die Aktivität von Tribbles abgebaut werden, Cdc25<sup>string</sup>, Twine und Slbo, zeigen nach vorläufigen Analysen keine gemeinsamen strukturellen Merkmale und lassen daher keinen Aufschluß auf ein mögliches Erkennungsmotiv für Tribbles zu (Rorth et al., 2000). Die Tatsache, daß Tribbles am Abbau anderer Proteine mitwirkt, ist dabei in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Injektionsexperimente, die Tribbles als zytoplasmatisches Protein ausweisen.

Aus den bisher vorliegenden Daten läßt sich nur schwerlich ein schlüssiges Modell ableiten, daß die Funktion von Tribbles erklärt. Aber es ist interessant, daß mit der border cell migration ein weiterer morphogenetischer Prozeß durch Tribbles reguliert wird. Wenn dies ein Indiz dafür sein sollte, daß Tribbles ein Faktor ist, der durch Verbindung zur Proteinabbau-Maschinerie der Zelle in sehr verschiedene zellbiologische Prozesse eingreift (Transkription, Mitosen), um morphogenetische Prozesse zu kontrollieren, dann kann mit Spannung erhofft werden, noch weitere Funktionen von Tribbles zu entdecken. Das dynamische Expressionsmuster von *tribbles* während der Embryogenese läßt da viel Spielraum für Spekulationen.

Die genetische Regulation von *tribbles* im Mesoderm ist auf Grundlage der bisherigen Daten noch unklar. Es kann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden,

daß *twist* nicht an der Kontrolle von *frühstart* oder *tribbles* beteiligt ist, denn die Expression von Cdc25<sup>string</sup> in *twist*-Mutanten hätte bei Abwesenheit einer der beiden Faktoren im Mesoderm der *twist*-Mutanten zur Auslösung von frühzeitigen Teilungen führen müssen. Möglicherweise ist *snail* an der Kontrolle der Teilungsblockierung beteiligt. Dies läßt sich mit den bisherigen Ergebnissen nicht abschließend beurteilen. Es wäre sinnvoll, das Experiment, in dem Cdc25<sup>string</sup> im Mesoderm von *snail*-Mutanten exprimiert wurde, zu wiederholen und zusätzlich eine Nullmutation für Cdc25<sup>string</sup> einzuführen. Damit würde sich die in *snail*-Mutanten verbleibende native Expression von Cdc25<sup>string</sup> vermeiden lassen und nur die Wirkung des Transgens könnte beurteilt werden.

Ob *tribbles* noch in anderen Entwicklungsabschnitten an der Kontrolle von Zellteilungen beteiligt ist, bleibt eine offene Frage. In *Drosophila* gibt es zumindest einen Prozess, wo dies zutrifft. Während der Gastrulation koordiniert *tribbles* die Zellformänderungen, die für die Invagination des Mesoderms die Grundlage bilden, mit den Teilungen des Mesoderms. Beide Prozesse verlaufen sehr schnell, und sie folgen normalerweise sehr schnell aufeinander. Laufen sie gleichzeitig ab kommt es in den Zellen zu widersprüchlichen Interessen und die Morphogenese wird erheblich gestört. Für einen sich schnell entwickelnden Organismus gibt es den Zwang unterschiedliche Prozesse miteinander zu verzahnen und zu koordinieren. Welche Funktion die vermutlichen Vertebraten-Homologe in Hund, Maus, Ratte oder Mensch haben, bleibt abzuwarten und wird hoffentlich bald weiter aufgeklärt.

Für *Drosophila* ist die Koordination solch schnell ablaufender Prozesse wohl nur einer von vielen Mechanismen, die der Fliege erlauben, sich so schnell zu entwickeln.

## Kapitel 4:

## Zusammenfassung und abstract

### Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war eine Ausweitung des Verständnisses der genetischen Mechanismen, die die Gastrulationsprozesse in *Drosophila melanogaster* kontrollieren. Das besondere Interesse galt dabei dem Beginn der Morphogenese der Mesodermanlage, der Ventralfurchenbildung.

Dazu wurden mehrere Ansätze verfolgt. Einerseits wurde die Funktion zweier bereits bekannter Faktoren untersucht. Snail und Twist sind zwei Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung des Mesoderms essentiell sind, deren genaue Funktion für diesen Prozess allerdings nicht geklärt ist und daher näher analysiert werden sollte. Die im Verlauf der Arbeit gesammelten Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Snail während der Gastrulation eine notwendige Funktion als Repressor hat. Darüber hinaus wurden Indizien gesammelt, die darauf hinweisen, daß die Rolle von Snail über die eines bloßen Repressors hinausgeht.

Untersuchungen der Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors Twist, seiner Ausfallmutation und damit verbundene Rettungsexperimente legen den Schluß nahe, daß Twist mehr Zielgene haben muß als bisher bekannt sind.

Im Einklang damit erfolgte der Versuch, neue genetische Loci zu identifizieren, die für eine normale Mesodermmorphogenese gebraucht werden. Mit Hilfe einer Sammlung von Fliegenstämmen mit autosomalen Deletionen wurde dazu in einem genomweiten Screen nach Genen gesucht, die an der Ventralfurchenbildung im *Drosophila*-Embryo beteiligt sind. Vier chromosomale Regionen konnten identifiziert werden, deren Anwesenheit für eine normale Gastrulation notwendig ist. Zwei dieser Loci wurden näher untersucht. In einem der beiden Fälle konnte das verantwortliche Gen, *tribbles*, identifiziert werden. Es ist Teil eines bis dahin unbekannten Mechanismus, der während der Gastrulation von *Drosophila* für die Koordination von Proliferation und Morphogenese notwendig ist, was den betroffenen Zellen die rasche und ungestörte Abfolge dieser beiden zellbiologisch konträren Prozesse ermöglicht.



## Abstract

The aim of this work was to extend the understanding of the genetic mechanisms which control gastrulation in *Drosophila*. It focussed on the formation of the ventral furrow which marks the beginning of morphogenesis of the mesodermal anlage.

The problem was approached from different directions. On one hand the function of two already known factors was examined. Snail and Twist are two transcription factors which are essential for development of the mesoderm, but it is unclear in which way they control mesoderm morphogenesis. The results of this work support the idea that repression by the zinc finger transcription factor Snail is a major and essential part of its activity. In addition the results suggest that Snail might not only be a repressor but may be also an activator of gene transcription.

Analysis of the phenotype of twist mutants as well as rescue experiments employing its known target genes strongly suggest that Twist must have more target genes than are known so far.

In parallel to this a genetic screen making use of a collection of fly stocks carrying large autosomal deletions was performed. It aimed at identifying genetic loci, that uncover new genes involved in gastrulation. Four loci could be identified whose presence is necessary for normal formation of the ventral furrow. Two of this loci were examined in more detail. In one of the two cases the corresponding gene, *tribbles*, could be identified. Analysis of *tribbles* and its loss of function phenotype showed that it is part of a so far unknown mechanism which coordinates proliferation and morphogenesis of the mesoderm, thereby avoiding conflicting cell biological processes to happen simultaneously within the same cells.

## **Kapitel 5     Material und Methoden**

### **5.1.     Material**

#### **5.1.1. Chemikalien**

Die verwendete Agarose stammte entweder von BRL (Eggenstein) oder von AGS (Heidelberg). Aquaphenol (wassergesättigtes Phenol) wurde von der Firma Applichem (Darmstadt) bezogen. Das Vectastain-ABC-Kit und Vectashield-Einbettungsmedium von Vector-Laboratories wurden über Camon-Labor-Service (Wiesbaden) bezogen. Radioaktiv markierte Substanzen stammten von Amersham (Braunschweig). Bei den sonstigen Chemikalien handelte es sich, falls nicht anders vermerkt, um analysenreine Substanzen der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe). Die Zutaten für Bakterienmedien stammten von BRL (Eggenstein).

#### **5.1.2. Computer, Software und digitale Bildbearbeitung**

Es wurden Apple Macintosh Computer mit folgenden Programmen verwendet: Adobe Photoshop (Adobe Systems), Canvas (Deneba Systems), GOG (Wisconsin Sequence Analysis Package), IPLab Spectrum (Signal Analytics), Microsoft Word (Microsoft Corp.), Netscape Communicator (Netscape Communication Corp.) und PHYLIP (Felsenstein, 1988; Felsenstein, 1993).

Digitale Photos wurden mit der Kamera Quantix (Photometrics) oder ProgRes 3008 (Kontron Elektronik) aufgenommen.

#### **5.1.3 Enzyme und andere Proteine**

Die verwendeten Enzyme und anderen Proteine stammten von Boehringer (Mannheim, Boehringer Ingelheim Bioproducts (früher: Promega; Heidelberg), BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach/Taunus), Pharmacia (Freiburg) oder Stratagene (Heidelberg).

#### Primäre Antikörper:

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| anti-gamma-Tubulin aus Ratte | (Amersham, Braunschweig)     |
| anti-Twist aus Kaninchen     | S. Roth, (Roth et al., 1989) |

|                                       |                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| anti-Eve aus Kaninchen                | M. Frasch, (Frasch and Levine, 1987) |
| anti-beta-Galactosidase aus Kaninchen | (Capple Research Products, USA)      |
| anti-Phospho-Histon3 aus Kaninchen    | (Upstate Biotechnology, USA)         |

Sekundäre Antikörper (anti-Kaninchen, biotinyliert, anti-Ratte, biotinyliert) wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

### 5.1.4. Bakterienstämme

XL1-Blue oder DH5alpha (Stratagene). Selektion mit Ampicillin oder Chloramphenicol.

### 5.1.5 Fliegenfutter

Fliegenfutter wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

#### Zutaten:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Wasser:                             | 10 l    |
| Fadenagar (Brecht, Eggenstein):     | 80 g    |
| Trockenhefe (Brecht, Eggenstein):   | 180 g   |
| Sojamehl (Neuform, Hamburg):        | 100 g   |
| Rübensirup (Grafschafter Goldsaft): | 220 g   |
| Malzextrakt (Diamalt, Ulm):         | 800 g   |
| Maismehl (Neuform, Hamburg):        | 800 g   |
| Propionsäure:                       | 62,5 ml |

Den Agar durch Aufkochen in Wasser auflösen, die restlichen Zutaten, bis auf die Propionsäure, zugeben und bei gelegentlichem Umrühren etwa 2 h kochen lassen. Nach dem Abkühlen auf 60° C die Propionsäure zugeben und das Futter in geeignete Röhren gießen.

Apfelsaftagarplatten wurden nach Wieschaus und Nüsslein-Volhard (Wieschaus und Nüsslein-Volhard, 1986) hergestellt, wobei jedoch anstelle von 6 g Nipagin (p-

Hydroxybenzoesäure-Methylester, Methylparaben) 40 ml einer 15%igen Lösung in Ethanol eingesetzt wurden.

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Molekularbiologische Methoden**

Die Mehrzahl der angewandten molekularbiologischen Methoden ist bei Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) beschrieben.

#### **5.2.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen für die DNA-Transformation**

Kompetente *E.coli* Zellen für die DANN-Transformation wurden nach einem von Hanahan beschriebenen Verfahren (Hanahan et al., 1995) hergestellt.

#### **5.2.1.2 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte auf einem ABI-Sequencer (Modell 373 und 377) mit dem Dye-Terminator Kit von Perkin-Elmer. Die DNA zur Sequenzierung wurde nach dem von Stemmer beschriebenen Verfahren (Stemmer, 1991) gereinigt. Für die Reinigung einzelstängiger DNA zum Sequenzieren wurden der Bakterienstamm TG1 und der Helferphage M13K07 (Promega) eingesetzt.

#### **5.2.1.3 Herstellung transgener Konstrukte**

Das zur Herstellung von Fliegen mit twist-unabhängiger mesodermaler fog-Expression verwendete PE::fog-Konstrukt wurde hergestellt ausgehend von einem 2,9 kb fog cDNA-Fragment in pBluescript (Costa et al., 1994). Die fog cDNA wurde mit PvuII vollständig aus pBluescript herausgeschnitten und in die SmaI Schnittstelle von pSP72 inseriert. Die cDNA wurde dann aus pSP72 mit BglII und XbaI wieder herausgeschnitten. Das resultierende Fragment wurde in die BamHI/XbaI-Schnittstelle des PE-Vektors (Jiang et al., 1991; Jiang and Levine, 1993) eingesetzt, nachdem aus diesem das korrespondierende Fragment, welches

ein lacZ-Gen enthält, entfernt wurde. Das somit entstehende Konstrukt wurde zur Transformation verwendet. Die fog cDNA stammt von Mike Costa und Eric Wieschaus.

### **5.2.2. Fliegen**

Die grundlegenden Techniken für den Umgang mit *Drosophila* sind bei Roberts (Roberts, 1986) beschrieben. Die Zusammensetzung des verwendeten Fliegenfutters ist oben (5.1.5) angegeben. Zur Sammlung von Embryonen wurde vorgegangen wie bei Wieschaus und Nüsslein-Volhard beschrieben (Wieschaus und Nüsslein-Volhard, 1986).

#### **5.2.2.1 Fixierung von Embryonen**

Die Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen und in situ-Hybridisierungen erfolgte an der Phasengrenze zwischen 3,78% Formaldehyd und Heptan. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Die Embryonen werden auf den Apfelsaftplatten mit einer Hypochloridlösung (ca. 6% aktives Chlor) dechorioniert, durch Siebe gegossen und mit 0,2% Tween20 in Leitungswasser gewaschen. Dann werden sie in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, die 700µl Heptan und 700µl 3,7% Formaldehyd enthalten, und für 25 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die wässrige (untere) Phase entnommen, und nach Zugabe von 700µl Methanol wird zur Entfernung der Viellinmembran für 30 s kräftig geschüttelt. Es wird mehrmals mit Methanol gewaschen und die Embryonen werden dann mit PBST (=PBS + 0,2% Tween20) rehydratisiert.

#### **5.2.2.2 Antikörperfärbung**

Für Antikörperfärbungen von Embryonen wurde nach dem bei Mitchison und Sedat (Mitchison und Sedat, 1983) beschriebenen Verfahren vorgegangen; anstelle von Puffer AM wurde jedoch PBS (s. Sambrook et al., 1989) eingesetzt und statt 10% NGS wurde zum Blockieren 10% BSA verwendet. Die sekundären Antikörper, die verwendet wurden, waren entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC, DTAF, TRITC, Rhodamin oder Cy3) oder mit Biotin gekoppelt. Für den Nachweis der fluoreszenten sekundären Antikörper wurden die

Embryonen in Vectashield eingebettet und unter einem Axiovert von Zeiss mit Auflichtfluoreszenz betrachtet.

Die biotinylierten sekundären Antikörper wurden mit dem Vectastain-ABC-Kit nach den Angaben des Herstellers nachgewiesen. Die gefärbten Embryonen wurden in Kunstharz (Durcupan, Fluka) eingebettet und unter einem Axioplan von Zeiss betrachtet.

Querschnitte von in Kunstharz eingebetteten Embryonen wurden mit dem Microtom Jung RM 2065 von Leica angefertigt.

### **5.2.2.3 In situ-Hybridisierung**

Zum Nachweis von mRNA in Embryonen durch in situ-Hybridisierung wurde nach dem von Tautz und Pfeifle beschriebenen Verfahren vorgegangen (Tautz und Pfeifle, 1989). Als Sonden wurden mit dem DIG-RNA Labeling Kit von Boehringer Mannheim markierte DNA-Fragmente eingesetzt.

### **5.2.2.4 Herstellung transgener Fliegen**

Transgene Fliegen wurden durch Mikro-Injektion von DNA in Embryonen nach der von Spradling und Rubin publizierten Methode erhalten (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982; Spradling, 1986).

Es wird dabei ein Transformationsvektor für *Drosophila* verwendet (pCaSpeR) , der neben einem pUC-Rückgrat, das bei der Insertion ins Genom verloren geht, die für die Insertion notwendigen P-Element-Enden sowie das *white* Minigen als Transformationsmarker enthält.

### **5.2.2.5 Fliegenstämme**

Als Wildtyp-Stamm wurde Orgeon R verwendet. Die meisten der Stämme, die autosomale Deletionen tragen, stammten vom Bloomington Stock Center in Indiana, USA (Deficiency Kits for Chromosome 2 and 3 (DK2 and DK3)). Diese sind in Flybase beschrieben : <http://flybase.bio.indiana.edu/>. Zusätzliche Fliegenstämme mit Deletionen, Punktmutationen oder P-Element-Insertionen stammten vor allem von T. Hummel und K. Schimmelpfeng (ehemals C. Klämbt-Labor), den European Stock Centers in Umeå, Schweden und Szeged, Ungarn oder vom MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen. Das verwendete twist Null Allel

war  $twi^{EY53}$ , das snail Null Allel war Df(2L)TE116GW11. Beide Stämme stammen von Rolf Reuter, Tübingen. Das verwendete amorphe Allel von folded gastrulation war  $fog^{4a6}$  und stammt von E. Wieschaus, Princeton, USA. Der Stamm, der das 2-PE::sna-Konstrukt enthält, stammte von T.IP (Ip et al. 1994).

Eine Liste der verwendeten Stämme mit autosomalen Deletionen befindet sich im Anhang am Ende dieses Kapitels.

### **5.2.3 Umgang mit gefärbten Embryonen**

#### **5.2.3.1 Einbetten der Embryonen in Araldit**

Zum Einbetten der gefärbten Embryonen werden diese wieder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dort werden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und schließlich in trockenes Ethanol überführt. Dann wird das Ethanol abgenommen und trockenes Aceton zugegeben. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (aus Kunststoff) werden die Embryonen in ein lichtdurchlässiges Kunststoffschälchen (Schappdeckel von Scintillationsgefäßen) überführt, das mit einer 1:1 Mischung aus Araldit und trockenem Aceton gefüllt ist. Nach einigen Stunden ist genügend Aceton verdampft, um die Embryonen im nun zähflüssigen Araldit sortieren zu können.

#### ***Herstellung von Araldit***

Es wurde Durcupan ACM von Fulka verwendet. Die verschiedenen Komponenten müssen in bestimmter Reihenfolge sorgfältig miteinander vermischt werden. 54,33 g Epoxidharz (Komponente A) und 47,41 g Härter (Komponente B) werden über Nacht in einem lichtdurchlässigen Kunststoffbehälter mit einem elektrischen Rührer gemischt. Sind keine Schlieren mehr in dem Gemisch zu sehen, werden unter einem Abzug unter ständigem Rühren langsam 3,5 ml der Komponente B zugegeben. Nach einiger Zeit des Rührens können nun langsam 2 ml der Komponente C zugegeben werden. Ist alles gut vermischt, wird das Araldit in 10 ml Einwegspritzen aufgezogen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.2.3.2 Sortieren von Embryonen

Die Embryonen werden in den mit Araldit gefüllten Kunststoffschälchen mit einer feinen Wolframnadel sortiert. Das lichtdurchlässige Kunststoffschälchen wird dazu auf den Tisch eines Stereomikroskopes mit Durchlicht gelegt. Die Embryonen lassen sich in dem viskosen Araldit relativ einfach aufreihen. Die Embryonen wurden nach den verschiedenen Entwicklungsstadien sortiert.

In dieser Arbeit wurde in vielen Fällen versucht, die heterozygot und homozygot mutanten Embryonen einer gefärbten Sammlung zu unterscheiden. Hierfür werden die Embryonen eines Entwicklungsstadiums miteinander verglichen. Wird eine Veränderung des Expressionsmusters eines Genes festgestellt, so wird versucht, den frühest möglichen Zeitpunkt dieser Veränderung zu bestimmen.

### Anhang: Liste der untersuchten Stämme mit autosomalen Deletionen (sortiert nach Bruchpunkten)

| <b>Stamm-<br/>Nummer</b> | <b>Genotyp</b>  | <b>Deletion<br/>(cytologisch)</b>                   | <b>Herkunft</b> |
|--------------------------|---|---|-----------------|
| 3638                     | Df(2L) net-PMF / SM6a   | 21A1 ; 21B7-8                                       | Bl (Kr.)        |
| 3548                     | Df(2L) al, cn[*] / In(2L) Cy  | 21B8;21C8-D1  | (Kr.)           |
| 45500                    | Df(2L) S2 / In(2L+2R)Cy , Cy E(S)                                       | 21C6-D1;22A6-B1                                     | (Kr.)           |
| 3133                     | Df(2L) dp79b , dp[DA} cn{1} / In(2LR) bw[V1] , b[1] ^does not delete dp | 22A2-3 ; 22D5-E1<br>21C8-D1;60D1-2 +<br>40F;59D4-E1 | Bl (Kr.)        |
| 90                       | Df(2L) C144,dpp[d-ho] ed[1] / Gla[1] Bc[1] Elp[1]                       | 23A1-2 ; 23C3-5                                     | (Kr.)           |
| 97                       | Df(2L) JS 32 , dpp[d-ho] / SM6a   | 23C3-5 ; 23D1-2                                     | Bl (Kr.)        |



|         |   |                          |           |
|---------|---|--------------------------|-----------|
| 712     | Df(2L) ed1 , al[1] b[1] / SM5   | 24A3-4 ; 24D3-4          | (Kr.)     |
| 693     | Df(2L)sc19-8 / SM6b ? , Cy[1]Roi[1] ;<br>Dp(2;1)B19 , y[1] , ed[1] dp[02] cl [1]                    | 24C2-8 ; 25C8- 9         | Bl (Kr.)  |
| 627     | Df(2L) sc19-5 / SM6b? , Cy[1] Roi[1];<br>Dp(2;1) B19<br>Df(1) y-ac sc[1] pn[1] , ed[1] dp[02] cl[1] | 25A4-5 ; 25D5-7          | (Kr.)     |
| 781     | Df(2L) c1-h3 / SM6b ? , Cy[1] Roi [1]   | 25D02-04;26B02-05        | Bl        |
| 45300   | Df(2L) Gpdh-A , dp L / SM1 , al[2]Cy cn[2]<br>sp[2]   | 25D7-E1 ; 26A8-9         | Um        |
| ade 2-2 | Df(2L) ade 2-2 / CyO?   | 25F2-3 ; 26D-E           | (Kr.)     |
| 45350   | Df(2L)J136-H52 / SM5 , al[2] ds[33k] Cy<br>lt[v] cn[2] sp[2]  | 27C02-09;28B03-04        | Um        |
| 45800   | Df(2L) spdx4 , In(2L) spdx4 , al dp /<br>CyO , Cy dp[lv1] pr cn [2]                                 | 27D-E ; 28C              | Um        |
| 45700   | Df(2L) wgCx3 , b pr / CyO   | 28A-? ; ?                | (Kr.)     |
| TE 128  | Df(2L) TE128 x    y w[m4h] ; Cy( O ? )  | 28E4-7 ; 29B2 - C1       | GR (Kr. ) |
| TE 196  | Df(2L) TE196 x    y w[m4h] ; y[+] Y; CyO  | 29E2 -F1 ; 30 C2 - 4     | GR (Kr. ) |
| 80760   | w ; CyO , Cy dp [lv1] pr cn[2] / Df(2L)3OC  | 29F07-30A01;<br>30C02-05 | Um        |
| 1045    | Df(2L) Mdha , cn / Dp(2;2) Mdha3 , cn   | 30D-F ; 31F              | Bl        |
| 1469    | Df(2L) S 39 / In(2L) Cy ;<br>Dp(2:Y) cb-50<br>Dp(1;y) B[S]Y y[+] / C9!) RM                          | 31A ; 32C-E              | (Kr.)     |
| 45400   | Df(2L) J-der-2 / SM1 , al[2] Cy cn[2] sp[2]   | 31B ; 32A                | Um        |

|           |  |                           |            |
|-----------|--|---------------------------|------------|
| 45487     | Df(2L) Prl / CyO , Cy dp[lv1] pr cn[2]                             | 32F01-03 ;33F01-02        | Um         |
| 3344      | Df(2L)prd1.7 , b Adh [n2] pr cn sca / CyO                          | 33B02-03 ; 34A01-02       | Bl         |
| 3138      | Df(2L) b87e25 / In (2L) N5   | 34B12 - C1 ; 35B10 - C1   | Bl ( Kr. ) |
| 41623     | CyO , Cy dp[lv1] Adh[nB] pr cn[2] / Df(2L) fn30 pr cn              | 34C06-07;35B09-C01        | Um         |
| 3078      | Df(2L) osp29 , Adh[uf3] pr cn / CyO                                | 35B01-03 ; 35E06          | Bl         |
| 1491      | Df(2L) r10 , cn / In(2LR)O, Cy dp[lvI] pr cn[2] ( ry floating ?? ) | 35E01-02;36A06-07         | Bl         |
| 42385     | CyO , Cy dp[lv1] pr cn[2] / Df(2L)H20, b pr cn sca                 | 36A08-09;36E03-04         | Um         |
| 420       | Df(2L) TW137 , cn[1] bw[1] / CyO , Dp(2:2) M(2) m[+]               | 36C2-4 ; 37B9-C1          | (Kr.)      |
| 3189      | Df(2L) TW50 , cn / CyO , Dp(2;2)M(2) m[+]                          | 36E04-F01;38A06-07 36F+ ? | Bl         |
| 3082      | Df(2L) pr76 . Sco / CyO  | 37D ; 38E                 | Bl         |
| 3346      | Df(2L) TW84 / CyO  | 37F05-38A01; 39D03-E01    | Bl         |
| 41800     | CyO , Cydp[lv1] pr cn[2] / Df(2L) TW161 , M(2)? cn bw              | 38A06-B01 ; 40A04-B01     | Um         |
| PR31 (C') | Df(2L) PR31 / SM1 lt   | 40A ; 40F                 | (Kr.)      |
| 739       | Df(2R)M41A4 / SM1  | 41A                       | Bl         |

|         |  |  |        |
|---------|--|--|--------|
| 749     | In(2R)bw[VDe2L]Cy[R] / In(2LR)Gla                                | 41A-B ; 42A02-03 (Df.)<br>58B01 ; 59 D06 (Dp.)<br>27D ; 51E (Dp.)<br>22D03-E01 ; 34A08-09(Dp.) | Bl     |
| 1006    | Df(2R) nap1 / In(2LR)Gla, Dp(2;2)BG                              | 41D02-E01 ; 42B01-03(Df.)<br>41BC-42BC (Dp.)   | Bl     |
| nap19   | Df(2R) nap19 / Gla + Dp(2;2)                                     | 41E02-F01 ; 43A02-B01  | ?(Kr.) |
| 1930    | Df(2R) pk 78 s / CyO ?   | 42B ; 42C  | ?(Kr.) |
| 46050   | Df(2R)cn88b, cn / SM5, al[2] Cy (Cy)                             | 42A ; 42E  | U      |
| 45960   | Df(2R)cn9 / Cy Roi   | 42E ; 44C  | U      |
| 45910   | Df(2R)44CE, al dp b pr / CyO,Cy dp[lv1] pr cn[2]<br>(Cy, dp, pr) | 44C ; 44E01-04   | U      |
| 42688 B | CyO / Df(2R)Np[3], bw  | 44D02-E01 ; 45B08-C01  | U      |
| 1743    | w[1118] ; Df(2R)B5, px[1] sp[1] / CyO, Adh[nB]                   | 46A ; 46C  | Bl     |
| 1702    | Df(2R)X1 / CyO, Adh[nB]  | 46C ; 47A01  | Bl     |
| 42685   | CyO / Df(2R) en[-A], en[-A]                                      | 47D03 ; 48A05-06   | U      |
| 1145    | Df(2R)en30 / SM5 ; Dp(1 ; Ybb[-]) B[S]                           | 48A03-04 ; 48C06-08 (Df.)<br>16A01-02 ; 20F (Dp.)  | Bl     |
| 46750   | Df(2R)vg135 / CyO, S dp cn bw                                    | 48C ; 49D  | U      |
| 442     | Df(2R)CX1, b[1] pr[1] / SM1                                      | 49C01-04 ; 50C23-D02   | Bl     |
| 46670   | Df(2R)trix / Cy ?  | 51A02-04 ; 51B06   | U      |
| 80850   | w[a] fa[g] ; CyO / Df(2R)Jp1                                     | 51C03 ; 52F05-09   | U      |
| 3520    | w[a] N[fa-g] ; Df(2R)Jp8, w[+] / CyO                             | 52F05-09 ; 52F10-53A01   | Bl     |

|        |  |   |                           |
|--------|--|---|---------------------------|
| 3064   | Df(2R) Pc 7B / CyO   | 54E8-F1 ; 55B9-C1   | ?(Kr.)                    |
| 46450  | Df(2R)PcIIIB, al dp b pr / CyO<br>(Cy,dp,pr)                               | 54F06-55A01 ; U<br>55C01-03   |                           |
| 42689  | CyO / Df(2R) Pc4   | 55A-55F   | U                         |
| 3467   | Df(2R)AA21, In(2R), c[1] px[1] sp[1] / SM1                                 | 56F09-17 ; 57D11-12<br>(Df.)<br>56D-E ; 58E-F (Df.)                                   | Bl                        |
| 46150  | Df(2R)PuD17, cu bw sp / SM1, al[2] Cy<br>cn[2] sp[2]                       | 57B04 ; 58B   | U                         |
| X58-7M | y / y[+] Y ; Df(2R) X58-7M, pr cn / CyO                                    | 58A1-2 ; 58E4-10  | Terry<br>O'Weaver<br>(CC) |
| X58-5M | y / y[+] Y ; Df(2R) X58-5M, pr cn M / SM5                                  | 58B01-02 ; 59A01  | ?(Kr.)                    |
| 45950  | Df(2R) bw S46 / ??   | 59D03-11 ; 60A07  | U?(Kr.)                   |
| 1682   | Df(2R)or-BR6, cn[1] bw[1] sp[1] / In(2LR)<br>lt[G16L]bw[V32gR]             | 59D05-10 ; 60B03-<br>08 (Df.)<br>40 ; 60E04[L]<br>40F ; 59E[R]                        | Bl                        |
| 1587   | Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR] / SM1  | 59D06-E01 ; 60C-D   | Bl                        |
| 1473   | In(2LR)Px4, dp[ov1] b[1] / CyO   | 60B ; 60D01-02 (Df.)<br>21D01 ; 22A03 (Dp.)<br>22A;60B;21C08;60D<br>;42A;<br>58A (In) | Bl                        |
| 46500  | Df(2R)Px[2], bw sp Px[2] / SM1   | 60C05-06 ; 60D09-<br>10   | U                         |
| 46100  | Df(2R)M-c[33a], M(2)[33a] / In(2LR)<br>bw[32vg], bw[32g]                   | 60E02-03 ; 60F01-02   | U                         |
| 42688  | CyO / Df(2R)gsb [ES1], b pr<br>(Cy,pr )                                    | 60E09-10 ; 60F01-02   | U                         |
| 46010  | Df(2R)Kr[SB1], b pr Bl c If[R] / SM1                                       | 60E10 ; 60F05   | U                         |
| 2577   | Df(3L)emc-E12/TM6B   | 61A ; 61D03   | Bl                        |
| 439    | Df(3L)Ar14-8, red[1]/ TM2,<br>emc[2] p[p] Ubx[130] e[s]<br>( = Df(3L)emc5) | 61C05-08 ;<br>62A08   | Bl                        |

|      |   |  |    |
|------|---|--|----|
| 2399 | Df(3L)R-G5, ve[1] / TM6   | 62A10-B01 ;<br>62C04-D01                 | Bl |
| 2400 | Df(3L)R-G7, ve[1] / TM6B  | 62B08-09 ;<br>62F02-05                   | Bl |
| 3650 | Df(3L)M21, ri[1] p[p[ /<br>In(3LR) T33[L] f19[R]                  | 62F; 63D (Df)<br>62A; 64C<br>(Dp auf In) | Bl |
| 3647 | Df(3L)HR370 /<br>In(3LR) T33[L] f19[R]                            | 63A01; 63D01<br>62A; 64C<br>(Dp auf In)  | Bl |
| 3649 | Df(3L)HR119 TM6B  | 063C06;<br>063E                          | Bl |
| 3687 | w[1118];<br>Df(3L)GN50 TM8,<br>l(3)DTS4[1] th[1] st[1] Sb[1] e[1] | 063E01-02;<br>064B17                     | Bl |
| 3686 | Df(3L)GN24 TM8,<br>l(3)DTS4[1] th[1] st[1] Sb[1] e[1]             | 063F04-07; 064C13-<br>15                 | Bl |
| 3096 | Df(3L)ZN47, ry[506] TM3   | 064C;<br>065C                            | Bl |
| 1420 | Df(3L)pbl-X1 TM6B * w[*] floating                                 | 065F03;<br>066B10                        | Bl |
| 1541 | y[1] w[1] N[spl-1] ;<br>Df(3L)66C-G28 TM3 IO                      | 066B08-09;<br>066C09-10                  | Bl |
| 3024 | Df(3L)h-i22, Ki[1] roe[1] p[p]/TM3                                | 66d10-11;<br>66e01-02                    | Bl |
| 1688 | Df(3L)Rdl-2/TM3, Sb[1]  | 66f ; 66f                                | Bl |
| 2479 | Df(3L)29A6, ri[1] p[p] / TM3                                      | 66f05 ; 67b01                            | Bl |
| 997  | Df(3L)AC1, roe[1] p[p] / TM3                                      | 67a05;67d07                              | Bl |
| 89   | y[1?]; Df(3L)lxd6 /<br>TM3, y[+] Sb[1] e[1] Ser[1]                | 67e01-02;<br>68c01-02                    | Bl |
| 2547 | Df(3L)vin2, ru[1] h[1] gl[2] e[4]ca[1] / TM3                      | 67f02-03;<br>68d06                       | Bl |

|      |  |                                     |    |
|------|--|-------------------------------------|----|
| 2611 | Df(3L)vin5, ru[1] h[1] gl[2] e[4]ca[1] / TM3                                     | 68a02-03;<br>69a01-03               | Bl |
| vin4 | bw; Df(3L)vin4, ru h st e / TM3, Sb Ser  | 68b1-3;<br>68f3-6                   | RR |
| 2612 | Df(3L)vin7, ru[1] h[1] gl[2] e[4]ca[1] / TM3                                     | 068C08-11;<br>069B04-05             | Bl |
| 3343 | Df(3L)Ly, mwh[1] / TM1,jv[*]   | 070A02-03;<br>070A05-06             | Bl |
| 3124 | Df(3L)fz-GF3b / TM6B   | 070C01-02;<br>070D04-05             | Bl |
| 3126 | Df(3L)fz-M21 / TM6   | 070D02-03;<br>071E04-05             | Bl |
| 2992 | Df(3L)BK10, ru[1] red[1] cv-c[1]<br>Sb[sbd-1] sr[1] e[1] / TM3                   | 071C; 071F                          | Bl |
| 3640 | Df(3L)brm11 /<br>Tm6C, cu[1] Sb[1] e[1] ca[1]                                    | 071F01-04;<br>072D01-10             | Bl |
| 2993 | Df(3L)st-f13, Ki[1] roe[1]<br>p[p] / TM6B  | 072C01-D01;<br>073A03-04            | Bl |
| 2998 | Df(3L)81k19 / TM6B   | 073A03; 074F                        | Bl |
| 2608 | Df(3L)W10, ru[1] h[1] Sb[sbd-2] / TM6B<br>*=W[+R10] see comment                  | 075A06-07;<br>075C01-02             | Bl |
| 2990 | Df(3L)Cat, ri[*] e[*] / TM6, Hn[p] ss[aπ88]<br>Ubx[bx-34e] Ubx[P15] e[11]        | 075B08;<br>075F01                   | Bl |
| 3000 | Df(3L)VW3 / TM3  | 076A03;<br>076B02                   | Bl |
| 2052 | Df(3L)rdgC-co, th[1] st[1] in[1]<br>ri[1] p[p] /<br>TM6C, Sb[1] cu[1] e[s] Tb[1] | 077A01;<br>077D01                   | Bl |
| 3127 | Df(3L)ri.79c / TM3   | 077B-C;<br>077F-78A                 | Bl |
| 3068 | Df(3L)Pc-MK / TM3,Sb[1] Ser[1]   | 078A02; 078C09                      | Bl |
| 3627 | Df(3L) 31A / Dp(3;3)C126,<br>st[1] cp[1] in[1] ri[1] p[p]                        | 078A; 078E (Df),<br>078D; 079B (Dp) | Bl |

|      |  |   |
|------|--|---|
| 3688 | Dp(3;1)2-2, w[1118] / ?;<br>Df(3R)2-2 / TM3  | 081F; 082F10-11 B1<br>(Df),<br>081F; 082F10-11;<br>003D (Dp)                    |
| 339  | w[1118];<br>Df(3R)6-7/TM3, Sb[1]   | 82d03-08; B1<br>82f   |
| 1990 | Df(3R)Tp110, Tp(3;3)Dfd[rv1], ri[1]p[p] /<br>TM3   | 083C01-02; 084B01- B1<br>02 (Df),<br>083D04-05;<br>084A04-05;<br>089F01-02 (Tp) |
| 1884 | Df(3R)Scr, p[p] e[s] / TM3   | 084A01-02; 084B01- B1<br>02   |
| 1842 | Df(3R)Antp17/ TM3 *<br>(= Antp[N+R17])   | 084B01-02; 084D11- B1<br>12   |
| 1968 | Df(3R)p712, red[1] e[1]/ TM3   | 084D04-06; 085B06, B1<br>(Df)<br>025D; 085B06                                   |
| 1962 | Df(3R)p-XT103, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/ TM3   | 085A02; B1<br>085C01-02   |
| 1931 | Df(3R)by10, red[1] e[1] / TM3  | 085D08-12; 085E07- B1<br>F01  |
| 1893 | Df(3R)by62, red[1] e[1] / TM1  | 085D11-14; 085F06 B1<br>041h; 085F06  |
| 2019 | w[1118];<br>Df(3R)Hu / TM3,<br>P{w[+mC]= HZR+6.8Xb}, ri[1] p[p]sep[1]<br>1(3)89Aa[1] Sb[1] Ubx[bx- | 086A06-B01; B1<br>086B03-06<br>(084D04-05;<br>084F01-02)                        |
| 3128 | Df(3R)M-Kx1/ TM3, Sb[1] Ser[1]   | 086C01; B1<br>087B01-05   |
| 3003 | Df(3R)T-32, (ri[1]) eu[1] sr[1] e[s] / MRS *<br>= TE32   | 086E02-04; 087C06- B1<br>07   |
| 3007 | Df(3R)ry615 / TM3, Sb[1] Ser[1]  | 087B11-13; 087E08- B1<br>11   |
| 1534 | Tp(3;Y)ry506-85C / MKRS  | 087D01-02; 088E05- B1<br>06; Y  |

|      |   |   |    |
|------|---|---|----|
| 383  | Df(3R)ea, ri[1] p[p]/TM3, Ser[1]  | 88E07-13; 89A01   | Bl |
| 1467 | Df(3R)P115, e[11] / TM1; Dp(3;1)P115<br>(* = Tp(3;1)P115)   | 089B07-08; 089E07-<br>08;<br>020                                    | Bl |
| 3071 | Df(3R)C4, p[*] / Dp(3;), Sb[1]  | 089E; 090A,<br>089E01-02; 090A                                      | Bl |
| 3010 | Df(3R)P14, sr[1] / T(2;3)ap[Xa]   | 090C02-D01;<br>091A01-02  | Bl |
| 3011 | Df(3R)Cha7/ TM6B ?  | 091A; 091F05  | Bl |
| 3012 | Df(3R)D1-BX12, ss[1] e[4] ro[1] / TM6B  | 091F01-02;<br>092D03-06   | Bl |
| 3340 | Df(3R)e-R1, Ki[1]/ TM3  | 093B03-05;<br>093D02-04   | Bl |
| 2425 | Df(3R)e-N19 / TM2   | 093B; 094   | Bl |
| EB6  | Df(3R)EB6/ TM6B, Tb   | 94C2-5;<br>94E3   | ML |
| M95A | Df(3R)M95A/ TM6B, Tb  | 94D; 95A3   | ML |
| 2362 | Df(3R)crb87-4, st[1] e[1] /<br>TM3, Ser[1]  | 095E08-F01;<br>095F15   | Bl |
| 2363 | Df(3R)crb87-5, st[1] e[1] /<br>TM3, Ser[1]  | 095F07;<br>096A17-18  | Bl |
| 1972 | In(3R)Ubx[7LL]ats[R], asp[1] ats[1] p[p] /<br>TM6B;<br>y / Dp(1;Y) y[+]<br>(* = Df(3R)XS, Dp(3R)XS) | 096A01-07; 096A21-<br>25; 089C; 089E,<br>001A01; 001B03-<br>04+?; Y | Bl |
| 2366 | Df(3R)XTA1, th[1] st[1] ri[1] roe[1] p[1] /<br>Dp(3;3)M95A[+]13, st[1] e[1]                         | 096B; 096D,<br>094D; 096E   | Bl |
| 1910 | Df(3R)T1-P, e[1] ca[1] / TM3, Ser[1]  | 097A;<br>098A01-02  | Bl |
| 430  | w[1118];<br>Df(3R)3450 / TM6B   | 098E03;<br>099A06-08  | Bl |
| 3547 | Df(3R)L127/TM6B;<br>Dp(3;1)B152   | 99b ; 99e   | Bl |



|      |   |  |    |
|------|---|--|----|
| 3546 | Ts(Ylt;3Lt)B81,<br>P{ry[+t7.2]=RP49}F2-80A e[1]/ TM3<br>Dp(3;1)67A<br>! = Df(3R)B81 | 99c08; 100f05<br>99d; 100f                 | Bl |
| 3369 | Df(3R)awd-KRB, ca[1] /<br>TM3, y[+] Sb[1] e[1] Ser[1]                               | 100c ; 100d                                | Bl |
| 1011 | Df(3R)faf-BP/TM8B   | 100d; 100f05                               | Bl |
| 758  | Df(4)M101-62f /<br>Dp(2;4) ey[D], Alp[eyD]: ey[D]                                   | 101e; 102b10-17<br>24a01;24a02;<br>101-102 | Bl |
| 759  | Df(4)G / ci[D]  | 102e02 ; 102e10                            | Bl |

Abkürzungen:

|     |   |  |
|-----|---|--|
| Bl  | : | Bloomington Stock Center, Indiana, USA |
| Cam | : | Cambridge, Ashburner Lab               |
| GR  | : | G. Reuter, Halle                       |
| Kr. | : | Kristina Schimmelpfeng/C.Klämbt        |
| RR  | : | Rolf Reuter, Uni Tübingen              |
| Tü  | : | Tübingen ( Max Planck Institut )       |
| U   | : | European Stock Center, Umeå, Sweden    |

**Kapitel 6: Literaturverzeichnis**

Anderson, K. V., Bokla, L., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell* 42, 791-798.

Arora, K., and Nusslein-Volhard, C. (1992). Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes. *Development* 114, 1003-1024.

Ashton, K., Wagoner, A. P., Carrillo, R., and Gibson, G. (2001). Quantitative trait loci for the monoamine-related traits heart rate and headless behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 157, 283-294.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., and Knust, E. (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 414, 638-643.

Barrett, K., Leptin, M., and Settleman, J. (1997). The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signalling pathway for cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* 91, 905-915.

Belvin, M. P., Jin, Y., and Anderson, K. V. (1995). Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes Dev* 9, 783-793.

Bender, L. B., Kooh, P. J., and Muskavitch, M. A. (1993). Complex function and expression of Delta during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 133, 967-978.

Berger, S. L., Cress, W. D., Cress, A., Triezenberg, S. J., and Guarente, L. (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.

Bettler, D., Schmid, A., and Yedvobnick, B. (1991). Early ventral expression of the *Drosophila* neurogenic locus mastermind. *Dev Biol* 144, 436-439.

Biehs, B., Francois, V., and Bier, E. (1996). The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes Dev* 10, 2922-2934.

Bier, E., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1990). rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 4, 190-203.

Bodmer, R. (1993). The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118, 719-729.

- Brand, A. H., and N., N. P. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fate and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bronner, G., Chu-LaGraff, Q., Doe, C. Q., Cohen, B., Weigel, D., Taubert, H., and Jackle, H. (1994). Sp1/egr-like zinc-finger protein required for endoderm specification and germ-layer formation in *Drosophila*. *Nature* 369, 664-668.
- Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, 2nd edn (Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag).
- Campos-Ortega, J. A., and Jimenez, F. (1980). The effect of X-chromosome deficiencies on neurogenesis in *Drosophila*. *Basic Life Sci* 16, 201-222.
- Casal, J., and Leptin, M. (1996). Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 10327-10322.
- Chinnandurai, G. (2002). CtBP, an Unconventional Transcriptional Corepressor in Development and Oncogenesis. *Molecular Cell* 9, 213-224.
- Corbin, V., Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T., and Young, M. W. (1991). A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* 67, 311-323.
- Costa, M., Sweeton, D., and Wieschaus, E. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: cellular mechanisms of morphogenetic movements. In *The Development of Drosophila melanogaster*, A. Martinez -Arias, and M. Bate, eds. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 425-465.
- Costa, M., Wilson, E., and Wieschaus, E. (1994). A putative cell signal encoded by the *folded gastrulation* gene coordinates cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* 76, 1075-1089.
- Cress, W. D., and Triezenberg, S. J. (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* 251, 87-90.
- Crews, S. T., Thomas, J. B., and Goodman, C. S. (1988). The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* 52, 143-151.
- Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J. L., and Schedl, P. D. (1999). Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell* 99, 271-281.

- Edgar, B. A., and Datar, S. A. (1996). Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates Drosophila's early cell cycle program. *Genes And Development* 10, 1966-1977.
- Edgar, B. A., Lehman, D. A., and O'Farrell, P. H. (1994a). Transcriptional regulation of string (cdc25): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* 120, 3131-3143.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1989). Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. *Cell* 57, 177-187.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H. (1990). The three postblastoderm cell cycles of Drosophila embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* 62, 469-480.
- Edgar, B. A., Sprenger, F., Duronio, R. J., Leopold, P., and O'Farrell, P. H. (1994b). Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of Drosophila embryogenesis. *Genes And Development* 8, 440-452.
- Estes, P., Mosher, J., and Crews, S. T. (2001). Drosophila single-minded represses gene transcription by activating the expression of repressive factors. *Dev Biol* 232, 157-175.
- Foe, V. E. (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. *Development* 107, 1-22.
- Foe, V. E., Odell, G. M., and Edgar, B. A. (1993). Mitosis and morphogenesis in the Drosophila embryo: point and counterpoint. In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate, and A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 149-300.
- Gilbert, S. F. (1997). *Developmental Biology*, 5th edn, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland Massachusetts, USA).
- Govind, S. (1999). Control of development and immunity by rel transcription factors in Drosophila. *Oncogene* 18, 6875-6887.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E., and Skaer, H. (1996). The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 122, 951-959.
- Greenspan, R. J. (1997). *Fly pushing: the theory and practice of Drosophila genetics*, 1st edn (Cold Spring Harbor, CSH Laboratory Press).
- Grieder, N. C., Nellen, D., Burke, R., Basler, K., and Affolter, M. (1995). Schnurri is required for Drosophila Dpp signaling and encodes a zinc finger protein similar to the mammalian transcription factor PRDII-BF1. *Cell* 81, 791-800.

Grosshans, J., and Wieschaus, E. (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101, 523-531.

Großhans, J., and Wieschaus, E. (2002). A Genetic Link between Morphogenesis and Cell Division during the Formation of the Ventral Furrow in *Drosophila*. *Cell* 101, 523-531.

Häcker, U., and Perrimon, N. (1998). *DRhoGEF2* encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Genes and Development* 12, 274-284.

Han, K., and Manley, J. L. (1993). Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *Embo J* 12, 2723-2733.

Hawcroft, G., and Alphey, L. (1995). A *Drosophila* early embryonic ventral transcript encoding a protein phosphatase-1 binding protein. *Biochem Soc Trans* 23, 631S.

Hemavathy, K., Meng, X., and Ip, Y. T. (1997). Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 3683-3691.

Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* 414, 634-638.

Hunter, C., and Wieschaus, E. (2000). Regulated expression of *nullo* is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in the *Drosophila* blastoderm. *J Cell Biol* 150, 391-401.

Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E., and Levine, M. (1992a). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6, 1728-1739.

Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., and Levine, M. (1992b). Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6, 1518-1530.

Jaynes, J. B., and O'Farrell, P. H. (1991). Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *Embo J* 10, 1427-1433.

Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S., and Rushlow, C. (1999a). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* 96, 563-573.

Jazwinska, A., Rushlow, C., and Roth, S. (1999b). The role of *brinker* in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos. *Development* 126, 3323-3334.

Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T., and Levine, M. (1991a). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 5, 1881-1891.

Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T., and Levine, M. (1991b). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes and Development* 5, 1881-1891.

Jiang, J., and Levine, M. (1993). Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold responses to the dorsal gradient morphogen. *Cell* 72, 741-752.

Jimenez, F., Martin-Morris, L. E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D. R., and White, K. (1995). vnd, a gene required for early neurogenesis of *Drosophila*, encodes a homeodomain protein. *Embo J* 14, 3487-3495.

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Archives in Developmental Biology* 193, 283-295.

Kam, Z., Minden, J. S., Agard, D. A., Sedat, J. W., and Leptin, M. (1991). *Drosophila* gastrulation: analysis of cell shape changes in living embryos by three dimensional fluorescence microscopy. *Development* 112, 365-370.

Kasai, Y., Nambu, J. R., Lieberman, P. M., and Crews, S. T. (1992). Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3414-3418.

Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.

Knust, E., and Leptin, M. (1996). Adherens junctions in the *Drosophila* embryo: the role of E-cadherin in their establishment and morphogenetic functions. *BioEssays* 18, 609-612.

Kopczynski, C. C., and Muskavitch, M. A. (1989). Complex spatio-temporal accumulation of alternative transcripts from the neurogenic gene Delta during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 107, 623-636.

Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M., and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118-122.

- Lai, Z. C., Fortini, M. E., and Rubin, G. M. (1991). The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins. *Mech Dev* 34, 123-134.
- Leptin, M. (1991a). Mechanics And Genetics Of Cell Shape Changes During *Drosophila* Ventral Furrow Formation. In *Gastrulation*, R. Keller, ed. (New York, Plenum Press), pp. 199-212.
- Leptin, M. (1991b). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes and Development* 5, 1568-1576.
- Leptin, M. (1995). *Drosophila* gastrulation: from pattern formation to morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11, 189-212.
- Leptin, M. (1999). Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *Embo J* 18, 3187-3192.
- Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
- Magie, C. R., Meyer, M. R., Gorsuch, M. S., and Parkhurst, S. M. (1999). Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development* 126, 5353-5364.
- Markel, H., Chandler, J., and Werr, W. (2002). Translational fusions with the engrailed repressor domain efficiently convert plant transcription factors into dominant-negative functions. *Nucleic Acids Res* 30, 4709-4719.
- Martinez -Arias, A., and Bate, M. (1993). *The Development of Drosophila melanogaster* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A., and Rorth, P. (2000). Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 101, 511-522.
- Mayumi-Matsuda, K., Kojima, S., Suzuki, H., and Sakata, T. (1999). Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 258, 260-264.
- Montgomery, M. K., Xu, S., and Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 95, 15502-15507.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). The *spatzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 76, 677-688.

- Morize, P., Christiansen, A. E., Costa, M., Parks, S., and Wieschaus, E. (1998). Hyperactivation of the *folded gastrulation* pathway induces specific cell shape changes. *Development* *125*, 589-597.
- Muller, H. A., and Wieschaus, E. (1996). *armadillo*, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* *134*, 149-163.
- Nambu, J. R., Franks, R. G., Hu, S., and Crews, S. T. (1990). The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* *63*, 63-75.
- Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S., and Levine, M. (1998a). dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Krüppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *Embo Journal* *17*, 7009-7020.
- Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. (1998b). Interaction of Short-Range Repressors with *Drosophila* CtBP in the Embryo. *Science* *280*, 101-104.
- Nieto, A. M. (2002). The Snail Superfamily Of Zinc-Finger Transcriptionfactors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *3*, 155-165.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Archives in Developmental Biology* *193*, 267-282.
- Okuda, M., and Okuda, D. (1997). *The Star Trek Encyclopedia. A Reference Guide to the Future* (New York, Pocket Books).
- Parks, S., and Wieschuas, E. (1991). The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G $\alpha$  like protein. *Cell* *64*, 447-458.
- Perrimon, N., Lanjuin, A., Arnold, C., and Noll, E. (1996). Zygotic lethal mutations with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*  
Part2: Loci on the second and third chromosomes identified by P-element-induced mutations. *Genetics* *144*, 1681-1692.
- Poortinga, G., Watanabe, M., and Parkhurst, S. M. (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *Embo J* *17*, 2067-2078.
- Postner, M. A., and Wieschaus, E. F. (1994). The *nullo* protein is a component of the actin-myosin network that mediates cellularization in *Drosophila melanogaster* embryos. *J Cell Sci* *107*, 1863-1873.



- Poulson, D. F. (1937). Chromosomal deficiencies and the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 23, 133-137.
- Reuter, R. (1994). The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* 120, 1123-1135.
- Reuter, R., and Leptin, M. (1994). Interacting functions of *snail*, *twist* and *huckebein* during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* 120, 1137-1150.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 2915-2922.
- Roberts, D. B. (1998). *Drosophila*, 2nd edn (Oxford, Oxford University Press).
- Rørth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 112418-112422.
- Rorth, P., Szabo, K., and Texido, G. (2000). The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol Cell* 6, 23-30.
- Roth, S. (1993). Mechanisms of dorsal-ventral axis determination in *Drosophila* embryos revealed by cytoplasmic transplantations. *Development* 117, 1385-1396.
- Roth, S., Stein, D., and Nusslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59, 1189-1202.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Schneider, D. S., Jin, Y., Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 1243-1250.
- Seher, T. C., and Leptin, M. (2000). Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10, 623-629.
- Shibata, K., Inagaki, M., and Ajiro, K. (1990). Mitosis-specific histone H3 phosphorylation in vitro in nucleosome structures. *European Journal Of Biochemistry* 192, 87-93.
- Simpson, P. (1983). Maternal-Zygotic Gene Interactions During Formation Of The Dorsoventral Pattern In *Drosophila* Embryos. *Genetics* 105, 615-632.

Simpson, P. (1984). Mutations And Chromosomal Rearrangements Affecting The Expression Of Snail, A Gene Involved In Embryonic Patterning In *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 108, 347-360.

Skeath, J. B., and Carroll, S. B. (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *Faseb J* 8, 714-721.

Skeath, J. B., Panganiban, G. F., and Carroll, S. B. (1994). The ventral nervous system defective gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* 120, 1517-1524.

Smith, A. V., King, J. A., and Orr-Weaver, T. L. (1993). Identification of genomic regions required for DNA replication during *Drosophila* embryogenesis. *Genetics* 135, 817-829.

Smoller, D., Friedel, C., Schmid, A., Bettler, D., Lam, L., and Yedvobnick, B. (1990). The *Drosophila* neurogenic locus mastermind encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers. *Genes Dev* 4, 1688-1700.

St. Johnston, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cerll* 68.

Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E., and Nusslein-Volhard, C. (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65, 725-735.

Straub, K. L., Stella, M. C., and Leptin, M. (1996). The gelsolin-related flightless I protein is required for actin distribution during cellularisation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 109, 263-270.

Strutt, D. I., and White, R. A. (1994). Characterisation of T48, a target of homeotic gene regulation in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* 46, 27-39.

Sweeton, D., Parks, S., Costa, M., and Wieschaus, E. (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and the posterior midgut invaginations. *Development* 112, 775-789.

Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T., and Hartenstein, V. (1996). shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* 10, 672-685.

Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M., and Leptin, M. (1998). The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* 2, 515-525.

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. Roux's Archives in Developmental Biology 193, 296-307.

Wilkin, F., Savonet, V., Radulescu, A., Petermans, J., Dumont, J. E., and Maenhaut, C. (1996). Identification and characterization of novel genes modulated in the thyroid of dogs treated with methimazole and propylthiouracil. Journal Of Biological Chemistry 271, 28451-28457.

Wilkin, F., Suarez-Huerta, N., Robaye, B., Peetermans, J., Libert, F., Dumont, J. E., and Maenhaut, C. (1997). Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. European Journal Of Biochemistry 248, 660-668.

Wolpert, L. (1998). Principles of Development, 1st edn (London & Oxford, Current Biology & Oxford University Press).

Yin, Z., Xu, X. L., and Frasch, M. (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. Development 124, 4971-4982.

Young, P. E., Pesacreta, T. C., and Kiehart, D. P. (1991). Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during *Drosophila* embryogenesis. Development 111, 1-14.

## Danksagung

Mein Dank gilt Maria Leptin, die mir die Gelegenheit gegeben hat an diesem wunderbaren Thema zu arbeiten. Darüber hinaus gilt ihr mein Dank für die Freiheit, die ich bei der Bearbeitung des Projekts hatte.

Siegfried Roth danke ich für die Übernahme des Gutachtens und für seine Beiträge zu meinem Verständnis von Entwicklungsbiologie.

Ich möchte allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Leptin, Sprenger, Klein, Reuter danken, für die schöne Zeit und für vieles mehr.

Und ich möchte meiner Familie und meinen Freunden danken, die oft für mich da waren und sind, und dafür, daß sie so sind wie sie sind.

T.S.

## Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnungen kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von der unten angegebenen Teilveröffentlichung noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Maria Leptin betreut worden.

Teilveröffentlichung:

**Seher, Thomas C. und Leptin, Maria** (2002). Tribbles, a cell cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Current Biology* 2000, **10**: 623-629

Ich versichere, daß ich alle Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Thomas-Christian Seher

